

Über den Einbau von ^{32}P in die Inositphosphatide des Rattenhirns

von

FELICITAS ANNA LISSAU

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Über den Einbau von ^{32}P in die Inositphosphatide des
Rattenhirns

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Felicitas Anna Lissau
aus
München

Dezember 1960



Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r

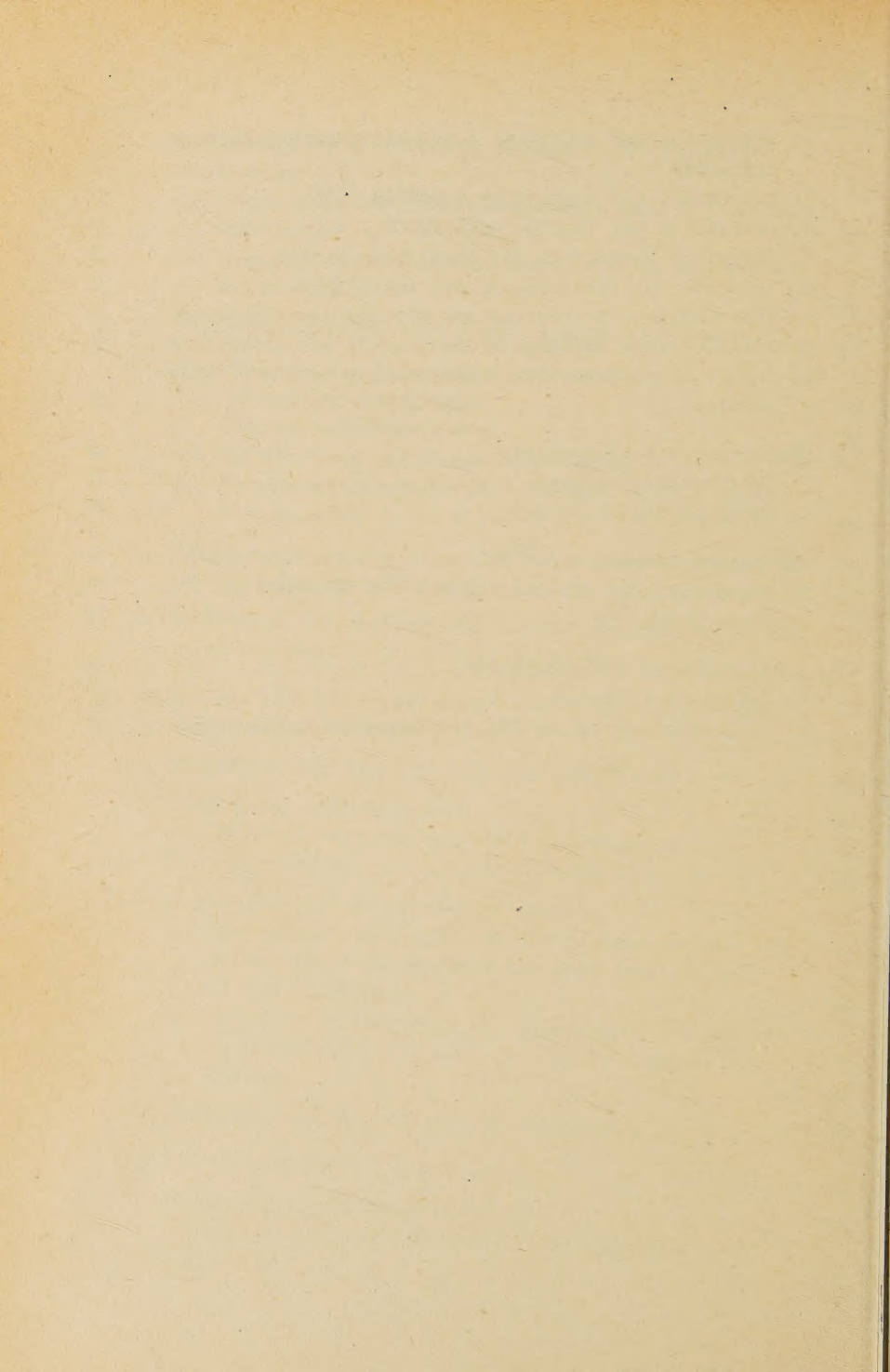
Tag der mündlichen Prüfung: **22. 2. 61**

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	2
A. Bisherige Arbeiten zur Struktur und Biochemie der äther- löslichen, tierischen Inositphosphatide	2
I. Vorkommen und Struktur	2
1.) Monophosphoinositid	2
2.) Diphosphoinositid	3
II. Biochemie	4
1.) Biosynthese	5
2.) Stoffwechsel	6
B. Extraktion und Auftrennung der Inositphosphatide des Rattenhirns.	8
I. Bisherige Extraktionsmethoden und Diskussion	8
α Präparative Methoden	8
β Mikromethoden	9
γ Zerstörung des Monophosphoinositids durch Trichlor- essigsäurefällung	11
II. Eigene Versuche zur Extraktbereitung	13
1.) Selektive Extraktion	13
2.) Anreicherungsversuche	13
3.) Fraktionierte Extraktion	14
4.) Durchführung	16
III. Papierchromatographische Auftrennung der Inositphos- phatide	16
IV. Identifizierung der Inositphosphatide	17
V. Zusammenfassung	18
C. Quantitative Phosphatidbestimmungen	20
Phosphatbestimmungen	21
Die Phosphor-Molybdänblau-Methode	21

I. Veraschung der organischen Substanz und Phosphatbestimmung	25
1.) Veraschung der Inositphosphatide nach Elution aus dem Papier	25
2.) Veraschung der Inositphosphatidflecke des Papierchromatogramms	26
II. Phosphatbestimmung nach Perchlorsäure-Veraschung . .	26
III. Durchführung der Phosphatidbestimmungen	27
1.) Veraschungsbedingungen	27
2.) Reduktionsbedingungen	28
3.) Durchführung der Phosphatbestimmung	29
4.) Berechnungsgrundlage der Phosphatide über ihren Phosphorwert	31
IV. Zusammensetzung der ätherlöslichen Phosphatidfraktion des Rattenhirns	31
V. Diskussion der neuen Phosphatidbestimmungsmethode und Vergleich mit den bisherigen Methoden	33
D. Einbau von ^{32}P in die ätherlöslichen Inositphosphatide des Rattenhirns	35
I. Markierung der Inositphosphatide mit ^{32}P in vivo . .	35
II. Messung der Radioaktivität	35
1.) Aktivitätsmessung mittels Strahlungsmeßgerät . .	35
2.) Aktivitätsmessung mittels Autoradiographie . . .	36
III. Ergebnisse der Untersuchungen mittels ^{32}P	39
1.) Spezifische Aktivität der Rattenhirne und der aus ihnen hergestellten Extrakte nach verschieden langem ^{32}P -Einbau	39
2.) Spezifische Aktivität der Phosphatide des Rattenhirn-Ätherextrakts nach verschieden langem ^{32}P -Einbau	40
IV. Diskussion der Ergebnisse des ^{32}P -Einbaus	48
EXPERIMENTELLER TEIL	50
A. Gewinnung der Inositphosphatide	50
1. Extraktion und Fraktionierung der Phosphatide nach FOLCH	50

	Seite
2. Extraktion und Reinigung der Inositphosphatide nach HAWTHORNE	51
3. Extraktion der Lipide nach DAWSON 1953	52
4. Extraktion der Lipide nach FOLCH	53
5. Selektive Extraktion der Inositphosphatide	53
6. Versuche zur Anreicherung der Inositphosphatide	53
7. Fraktionierte Extraktion der Lipide aus Kälberhirn	54
8. Fraktionierte Extraktion der Lipide aus Rattenhirn	58
9. Papierchromatographische Auftrennung der Inositphosphatide	59
 B. Quantitative Bestimmungen	62
1. Phosphatbestimmungen	62
2. Phosphatidbestimmungen	66
 C. Einbau und Messung von ^{32}P	72
1. Markierung der Phosphatide mit ^{32}P in vivo	72
2. Messung von ^{32}P	72
 D. Bezugsnachweis der Substanzen	81
1. Radioaktive Isotope	81
2. Vergleichssubstanzen für die Papierchromatographie	81



E I N L E I T U N G U N D Z I E L S E T Z U N G

Obwohl die Phosphatide als wesentlicher Bestandteil der Nervensubstanz seit langem bekannt sind, erschwert ihre komplexe Natur die Analyse und damit auch die biochemische und physiologische Untersuchung. So konnte erst 1942 FOLCH¹⁾ das Kephalin in Phosphatidylinosit, Phosphatidylserin und Phosphatidyläthanolamin fraktionieren.

Als in den folgenden Jahren unter Einsatz radioaktiver Isotope der Stoffwechsel dieser neugefundenen Phospholipide untersucht wurde, zeigten die Inositphosphatide verschiedener tierischer Organe einen besonders aktiven ³²P-Umsatz und ließen daher eine physiologische Sonderstellung innerhalb der Phosphatide vermuten.

HÖRHAMMER und Mitarbeiter²⁾ konnten nun kürzlich aus der Diphosphoinositid-haltigen FÖLCH-I-Fraktion des Rinderhirns durch hochstufige Craigverteilung auch ein Monophosphoinositid isolieren und außerdem das Diphosphoinositid durch Chromatographie auf Formaldehydpapier in drei Substanzen trennen. Erstmals wurde damit Diphosphoinositid und Monophosphoinositid in ein und demselben Organ aufgefunden und, da seit FOLCH und LEBARON³⁾ im Rinderhirn auch ein Inositphosphatid-Polypeptid bekannt ist, der Nachweis von fünf verschiedenen Inositphosphatiden erbracht.

Da bei früheren Untersuchungen des ³²P-Einbaus in die Gehirnpheosphatide immer nur das Vorkommen eines Inositphosphatids angenommen und beschrieben wurde, sollen die vorliegenden Untersuchungen die Zusammensetzung der Inositphosphatid-Fraktion des Rattenhirns und den ³²P-Umsatz der einzelnen Inositphosphatide klären.

1) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 146, 35 (1942)

2) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. J.HÖLZL, Biochem.Z. 330, 591 (1958)

3) F.N.LEBARON u. J.FOLCH, J.Neurochem. 1, 101 (1956)

ALLGEMEINER TEIL

A. Bisherige Arbeiten zur Struktur und Biochemie der ätherlöslichen, tierischen Inositphosphatide.

I. Vorkommen und Struktur

Die Inositphosphatide gehören zur Gruppe der Glycerinphosphatide und kommen im Tier- und Pflanzenreich weitverbreitet vor. Erstmals konnte ANDERSON⁴⁾ 1930 in Tuberkelbazillen Inosit als Lipoidbaustein nachweisen.

Die ätherlöslichen, tierischen Inositphosphatide sind aus Glycerin, Fettsäuren, Inosit und ein oder zwei Mol Phosphorsäure aufgebaut, wobei man entsprechend dem molaren Verhältnis von Phosphorsäure zu Inosit zwischen einem Monophosphoinositid und einem Diphosphoinositid unterscheiden kann.

1.) Monophosphoinositid

Nachdem es erstmals im Jahre 1954 von FAURE und MORELEC-COULON⁵⁾ aus Herzmuskel isoliert werden konnte, fanden McKIBBIN⁶⁾ und HAWTHORNE⁷⁾ das Monophosphoinositid auch in der Leber auf. Schließlich gelang es im Jahre 1958 HÖRHAMMER und Mitarbeitern⁸⁾ das gleiche Monophosphoinositid noch aus Rinderhirn zu isolieren. Mit Hilfe papierchromatographischer Methoden wurde es gleichzeitig von HOKIN und HOKIN⁹⁾ im Meerschweinchenhirn entdeckt. Dieselben Autoren beschrieben weiterhin zwei Monophosphoinositide in der Bauchspeicheldrüse¹⁰⁾. DAWSON untersuchte kürzlich die Phospholipide in "biologischem Material" und identifizierte die Inositphosphatide in Gehirn, Niere, Leber, Skelettmuskulatur, Lunge und Herzmuskel über die nach partieller Hydrolyse auftretenden Spaltstücke Glycerolphospho-

4) G.J.ANDERSON, J.Amer.chem.Soc. 52, 1607 (1930)

5) M.J.FAURE u. M.MORELEC-COULON, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 238, 411 (1954)

6) J.M.McKIBBIN, Federation Proc. 13, 262 (1954)

7) J.N.HAWTHORNE, Biochem.J., 59, 2F (1955)

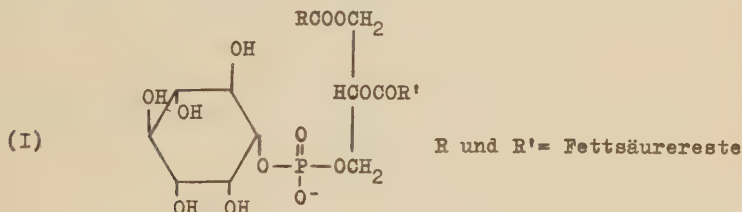
8) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. J.HÖLZL, Biochem.Z. 330, 591 (1958)

9) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, J.biol.Chemistry 233, 818 (1958)

10) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, ibid. 233, 805 (1958)

rylinositol und Phosphorylinositol als Monophosphoinositide¹¹⁾.

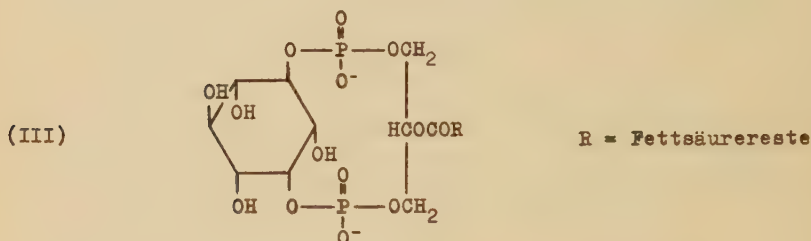
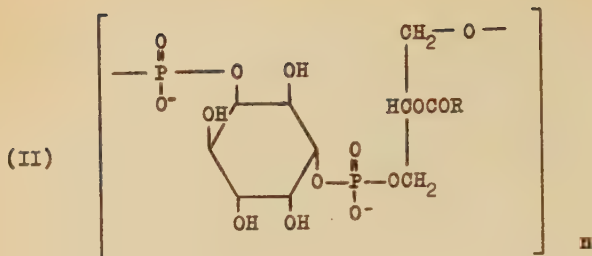
Mit der Strukturaufklärung des Monophosphoinositids beschäftigten sich gleichfalls FAURE und MORELEC-COULON¹²⁾. Sie kristallisierten die Substanz zunächst als Natriumsalz und schlugen auf Grund umfassender Untersuchungen¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾ eine dem Lecithin analoge Strukturformel vor, die anstelle des Cholins Inosit enthält (I):



2.) Diphosphoinositid

Während das Monophosphoinositid in fast allen tierischen Organen aufgefunden wurde, schien das Diphosphoinositid lediglich im Gehirn vorzukommen. Es wurde im Jahre 1949 von FOLCH¹⁶⁾ aus Rinderhirn erstmals isoliert. Aus seinen bei der Analyse in äquimolaren Mengen vorliegenden Bestandteilen Inositmetadiphosphat, Glycerin und Fettsäuren konstruierten FOLCH und LEBARON¹⁷⁾ die polymere Struktur (II), während HAWTHORNE¹⁸⁾ auf Grund eigener experimenteller Untersuchungen eine ringförmige Struktur (III) vorschlägt.

-
- 11) R.M.C.DAWSON, *Biochem.J.* **75**, 45 (1960)
 12) M.J.MORELEC-COULON u. M.FAURE, *Bull.Soc.Chim.biol.* **40**, 1067 (1958)
 13) M.J.MORELEC-COULON u. M.FAURE, *ibid.* **40**, 1071 (1958)
 14) M.J.MORELEC-COULON u. M.FAURE, *ibid.* **40**, 1307 (1958)
 15) M.J.MORELEC-COULON u. M.FAURE, *ibid.* **40**, 1315 (1958)
 16) J.FOLCH, *J.biol.Chemistry* **146**, 35 (1942)
 17) J.FOLCH u. F.N.LEBARON, *Can.J.Biochem.Physiol.* **34**, 304 (1956)
 18) J.N.HAWTHORNE, *Biochim.biophysica Acta* **18**, 389 (1955)



Nachdem sich neuerdings herausgestellt hat, daß es sich beim "Diphosphoinositid" um ein Gemisch handelt¹⁹⁾, bleiben die beiden Strukturformeln von FOLCH und von HAWTHORNE noch so lange hypothetisch, bis die einzelnen Diphosphoinositid-Fractionen näher untersucht sind.

II. Biochemie

Obwohl die physiologische Rolle der Inositolphosphatide noch nicht geklärt ist, darf ihre Mitwirkung bei der oxydativen Phosphorylierung als ziemlich gesichert gelten²⁰⁾. Dagegen ist die Funktion des freien Inosit als Wachstumsfaktor vieler Mikroorganismen ebenso wie seine lipotrope, cholinähnliche Wirkung und seine Identität mit dem von EASTCOTT²¹⁾ beschriebenen Faktor Bios I²²⁾ hinreichend bekannt. EAGLE und Mitarbeiter²³⁾ zeigten kürzlich, daß jeder der 18 menschlichen Zelltypen, die sie in Gewebekulturen züchten konnten, Inosit zum Leben und Wachsen benötigt.

19) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u.J.HÖLZL, Biochem.Z. 330, 591 (1958)

20) J.GREENLESS u. W.W.WAINIO, J.biol.Chemistry 234, 658 (1959)

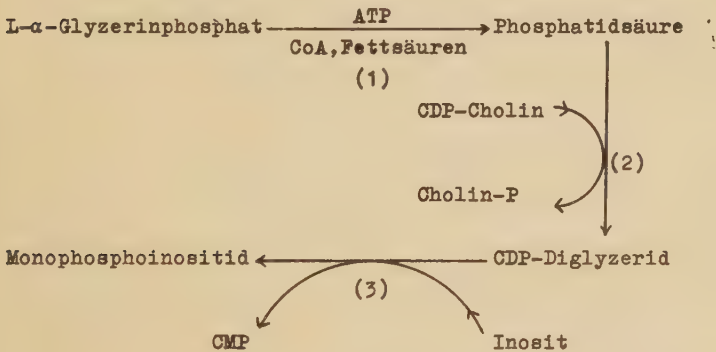
21) E.V.EASTCOTT, J.physic.Chem. 32, 1094 (1928)

22) F.KÖGL u. W.v.HASSELT, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.242,74(1936)

23) H.EAGLE, V.I.OYAMA, M.LEVY u.A.E.FREEMAN, J.biol.Chemistry 226, 191 (1957)

1.) Biosynthese

Die Bildung von Inositphosphatiden findet im Organismus entweder durch eine Austauschreaktion statt, bei der Inosit in ein Phosphatidmolekül eintritt, oder durch Neusynthese²⁴⁾²⁵⁾. Die Neusynthese des Monophosphoinositids verläuft nach Untersuchungen von AGRANOFF und Mitarbeitern²⁶⁾ über eine Cytidindiphosphat (=CDP)-Diglyzerid-Verbindung, die aus Phosphatidsäure und Cytidindiphosphatcholin gebildet wird (2). Das Cytidindiphosphat-Diglyzerid tauscht dann Cytidinmonophosphat (=CMP) gegen Inosit aus unter Bildung von Monophosphoinositid (3).



Nach PAULUS und KENNEDY²⁷⁾ dagegen ist das Cytidindiphosphatcholin bei der Neubildung von Monophosphoinositid inaktiv. Ihren Befunden zufolge reagiert die Phosphatidsäure mit Cytidintriphosphat (Reaktion 2) unter Abspaltung von Pyrophosphat und bildet Cytidindiphosphat-Diglyzerid wie nach dem von AGRANOFF und Mitarbeitern angegebenen Schema.

Noch nicht aufgeklärt ist aber die Biosynthese des Diphosphoinositids, deren Studium durch das gleichzeitige Vorkommen von Monophosphoinositid im Gehirn bedeutend erschwert wird.

- H. PAULUS u. E. P. KENNEDY, J. Amer. chem. Soc. 81, 4436 (1959)
- H. PAULUS u. E. P. KENNEDY, ibid. 80, 6689 (1958)
- B. W. AGRANOFF, R. M. BRADLEY u. R. O. BRADY, J. biol. Chemistry 233, 1077 (1958)
- H. PAULUS u. E. P. KENNEDY, J. biol. Chemistry 235, 1303 (1960)

2.) Stoffwechsel

Ganz besondere Aufmerksamkeit wird dem Stoffwechsel der Inositphosphatide zugewendet, seit DAWSON²⁸⁾²⁹⁾ bei der in vitro-Untersuchung des ^{32}P -Einbaus in die Phosphatide des Meerschweinchenhirns feststellte, daß "Diphosphoinositid" anorganisches Phosphat bedeutend schneller einbaut, als alle anderen Phosphatide. Diese physiologische Sonderstellung des "Diphosphoinositids" wurde durch den gleichen Befund von HOKIN und HOKIN³⁰⁾ befestigt, die weiterhin fanden, daß der ^{32}P -Einbau durch Azetylcholin noch gesteigert wird. Die Azetylcholinwirkung kann durch Atropin aufgehoben werden. Auch McMURRAY und Mitarbeiter³¹⁾ bestätigten die auffallend hohe Stoffwechselaktivität des Gehirn-"Diphosphoinositids" sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen.

Angeregt durch diese Befunde entstanden einige Arbeiten, die den Einfluß verschiedener Arzneimittel auf die ^{32}P -Einbau-Geschwindigkeit am Gehirn-"Diphosphoinositid" untersuchten. So beschrieben MAGEE und Mitarbeiter³²⁾ unter der Wirkung von Azacyclonol eine Beschleunigung des ^{32}P -Umsatzes von "Diphosphoinositid", Phosphatidylserin und Phosphatidsäure und eine Verzögerung bei Phosphatidyläthanolamin und -cholin. Daß dagegen höhere Konzentrationen von Azacyclonol (200 mg/kg) die gesamte Phosphatid-Bildung hemmen, beobachteten außer MAGEE und Mitarbeitern auch ANSELL und MORGAN³³⁾ am Rattenhirn. Keinerlei Veränderung der Einbaurate erfolgt nach den gleichen Autoren bei Reserpingabe und nach Befunden von ANSELL und DOHMEN³⁴⁾ durch Thiopentenon-Verabreichung. Dagegen sinkt sie sogar ab unter der Wirkung von Chlorpromazin und bei Tieren mit Insulin-Hypoglykämie.

28) R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 57, 237 (1954)

29) R.M.C.DAWSON, Biochim.biophysica Acta 14, 374 (1954)

30) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, Biochim.biophysica Acta 18, 102 (1955)

31) W.C.McMURRAY, K.P.STRICKLAND, J.F.BERRY u. R.J.ROSSITER, Biochem.J. 66, 634 (1957)

32) W.L.MAGEE, J.F.BERRY u. R.J.ROSSITER, Biochim.biophysica Acta 21, 408 (1956)

33) G.B.ANSELL u. A.MORGAN, Biochem.J. 69, 30P (1958)

34) G.B.ANSELL u. H.DOHMEN, J.Neurochem. 2, 1 (1957)

Im Gegensatz zum Gehirn-"Diphosphoinositid" unterscheidet sich das Monophosphoinositid der Leber hinsichtlich seines Phosphatumsatzes nicht von den anderen Leberphosphatiden³⁵⁾³⁶⁾.

Zu interessanten Schlußfolgerungen kamen aber HOKIN und HOKIN durch ihre Untersuchungen über den ^{32}P -Umsatz der Phosphatide verschiedener Drüsen bei gleichzeitiger Anregung der Sekretion. Sie fanden einen gesteigerten Phosphateinbau beim Monophosphoinositid der Bauchspeicheldrüse³⁷⁾, der Hypophyse³⁸⁾ und des Nebennierenmarks³⁹⁾ und schreiben deshalb dem Monophosphoinositid eine Rolle im Mechanismus des aktiven Transports durch die Zellmembran zu.

Durch den Nachweis von Monophosphoinositid im Gehirn, das nach HOKIN und HOKIN⁴⁰⁾ physiologisch hochaktiv ist, trat ein Stillstand in den Stoffwechseluntersuchungen der Gehirn-Inositolphosphatide ein. Es wurde weder die Frage geklärt inwieweit die bisherigen Ergebnisse auf das Di- oder das Monophosphoinositid oder auf eine Mischung beider zu beziehen sind, noch wurden neue Arbeiten in Angriff genommen, offenbar weil die angewendeten papierchromatographischen Methoden bei der Auftrennung der zwei Inositolphosphatide versagten.

-
- R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 61, 552 (1955)
G.V.MARINETTI, J.ERBLAND, M.ALBRECHT u. E.STOTZ, Biochim. biophysica Acta 25, 585 (1957)
L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, J.biol.Chemistry 233, 805 (1958)
L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, ibid. 233, 811 (1958)
L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, ibid. 233, 814 (1958)
L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, ibid. 233, 818 (1958)

B. Extraktion und Auftrennung der Inositphosphatide des Rattenhirns

Zur Untersuchung des ^{32}P -Einbaus in die Inositphosphatide des Gehirns standen ausgewachsene männliche Albinoratten zur Verfügung, deren Gehirne ein Frischgewicht von durchschnittlich 2 g hatten. Die Inositphosphatide jeweils eines Rattenhirns mußten extrahiert, angereichert und aufgetrennt werden.

I. Bisherige Extraktionsmethoden und Diskussion

a Präparative Methoden

Zur präparativen Isolierung der Inositphosphatide aus tierischem Material gibt es in der Hauptsache zwei bewährte Methoden:

- 1.) Nach der klassischen Vorschrift von FOLCH⁴¹⁾ wird das zerkleinerte Gewebe fraktioniert extrahiert. Die Vorextraktionen mit Aceton und mit Alkohol dienen zur Entwässerung und Entfernung von Cholesterin, Lecithin, Neutralfetten und freien Fettsäuren. Aus dem Petrolätherauszug wird das Rohkephalin gewonnen und durch mehrere Umfällungen gereinigt. Aus der Chloroformlösung des Kephalsins erhält FOLCH durch stufenweise Alkoholzugabe fünf Fraktionen, von denen Fraktion I die Ausgangssubstanz zur Darstellung des sogenannten Diphosphoinositid darstellt.
- 2.) HAWTHORNE⁴²⁾⁴³⁾ geht bei der Isolierung des Monophosphoinositids aus der Leber von einem Lipoid-Gesamtextrakt aus, den er mit Chloroform-Methanol (2:1) herstellt.

Nach Untersuchungen von SPERRY⁴⁴⁾ wird mit diesem von FOLCH und Mitarbeitern⁴⁵⁾ erstmalig verwendeten Gemisch eine vollständige Extraktion der Lipide bereits durch Homogenisieren des Gewebes bei Raumtemperatur erreicht. Es ist der BLOOR'schen Äthanol-Äther(3:1)-Mischung⁴⁶⁾ überlegen.

41) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 146, 35 (1942)

42) J.N.HAWTHORNE, Biochem. J. 59, 2p. (1955)

43) J.N.HAWTHORNE, Biochem. J. 75, 495 (1960)

44) W.M.SPERRY, Methods of Biochemical Analysis II p.86 (Interscience Publishers, Inc., New York)

45) J.FOLCH, I.ASCOLI, M.LEES, J.A.MEATH u.F.N.LEBARON, J.biol. Chemistry 191, 833 (1951)

46) W.R.BLOOR, J.biol.Chemistry 17, 377 (1914)

FrISChe Leber wird unter Zusatz von Chloroform-Methanol (2:1) homogenisiert, von den sich bildenden zwei Phasen die Wasser-Methanol-Oberphase verworfen und die Chloroformphase weiterverarbeitet. Nach zwei Aceton- und vier Äthanol-fällungen reinigt HAWTHORNE das rohe Monophospho-inositid durch Chromatographie an einer Kieselsäuresäule nach einer Methode von HANAHAN und Mitarbeitern⁴⁷⁾.

Beurteilung: Wie sich im Versuch zeigte, lassen sich die präparativen Methoden von POLCH und von HAWTHORNE nicht in den Mikromaßstab übertragen und sind daher zur Gewinnung der Inosithosphatide aus etwa 2 g frischem Rattenhirn ungeeignet.

β Mikromethoden

Im Rahmen von Untersuchungen mit radioaktiven Isotopen führten verschiedene Autoren Extraktionen von Phosphatiden im Mikromaßstab durch:

1.) Die Mehrzahl der Arbeiten beginnt die Extraktion mit einer Trichloressigsäurefällung der Proteide.

a) DAWSON (1953)⁴⁸⁾ fügt dem Gewebeprei 20%ige Trichloressigsäure zu, extrahiert dann nochmals mit 5%iger Trichloressigsäure und wäscht mit Wasser nach. Den Rückstand zieht er fünf Stunden im Soxhlet-Apparat mit Chloroform-Methanol (1:1) aus. Durch Ausschütteln mit Salzsäure entfernt er wasserlösliche Verunreinigungen und bezeichnet die Chloroformphase als "gereinigten Lipoid-extrakt", den er nach alkalischer Hydrolyse papierchromatographisch auftrennt.

b) AGRANOFF und Mitarbeiter⁴⁹⁾ verwenden den gleichen Arbeitsgang.

c) FRIEDEL⁵⁰⁾ führt zwischen Trichloressigsäure- und Chloroform-Methanol- noch eine Aceton-Extraktion durch.

47) D.J.HANAHAN, J.C.DITTMER u. E.WARASHINA, J.biol.Chemistry 228, 685 (1957)

48) R.M.C.DAWSON, Biochem. J. 55, 507 (1953)

49) E.W.AGRANOFF, R.M.BRADLEY u. R.O.BRADY, J.biol.Chemistry 233, 1077 (1958)

50) U.FRIEDEL, Dissertation Berlin

- d) HOKIN und Mitarbeiter⁵¹⁾ stellen einen Äthanol-Chloroform-Auszug her.
 - e) MARINETTI und Mitarbeiter⁵²⁾ verwenden zur Extraktion der Phosphatide Methanol-Äther (2:1).
 - f) KENNEDY⁵³⁾ suspendiert das Präzipitat der Trichloressigsäurefällung in Wasser und fügt dann absoluten Alkohol zu.
 - g) LOWRY und Mitarbeiter⁵⁴⁾ ziehen die gefällten Lipoproteide mit heißem Äthanol aus.
- 2.) DAWSON (1960) verwendet neuerdings⁵⁵⁾ die vereinfachte Vorschrift von FOLCH und Mitarbeitern⁵⁶⁾ zur Herstellung eines Lipoid-Gesamtauszugs aus tierischem Material. Dabei wird das Gewebe mit 24 T. Chloroform-Methanol (2:1) homogenisiert und das Filtrat mit 0.2 T. Wasser oder 0.9%iger Natriumchlorid-Lösung versetzt. Die Unterphase stellt dann den gereinigten Lipoidextrakt dar. Dieser wird einer alkalischen Hydrolyse unterworfen, die entstandenen Spaltprodukte anschließend papierchromatographisch aufgetrennt.

Beurteilung: Die beschriebenen Mikromethoden liefern einen Lipoidgesamtextrakt, von dem papierchromatographisch gerade noch 2 mg pro Auftragung eine gute Trennung ergeben (Abb. 1). Bei einem mittleren Extraktgehalt von 150 mg (Methode 1a: 155.1 mg; Methode 2: 146.7 mg) pro 2 g frischem Rattenhirn und einem Diphosphoinositid-Gehalt von 350 γ , berechnet aus dem Phosphorwert und einem mittleren Molekulargewicht von 850⁵⁷⁾, enthalten 2 mg Lipoidgesamtextrakt 4 - 5 γ Diphosphoinositid, verteilt auf zwei Flecke. Diese Konzentration reicht für einen papierchromatographischen Nachweis und zur Bestimmung des Phosphorgehalts nicht aus.

51) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, J.biol.Chemistry 233, 805 (1958)

52) G.V.MARINETTI, J.ERBLAND, M.ALBRECHT u.E.STÖTZ, Biochim. biophysica Acta 26, 130 (1957)

53) E.P.KENNEDY, J.biol. Chemistry 201, 399 (1953)

54) E.ROBINS, O.H.LOWRY, K.M.EYDT u.R.E.McCAMAN, J.biol.Chemistry 220, 661 (1956)

55) R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 75, 45 (1960)

56) J.FOLCH, M.LEES u. G.H.SLOANE-STANLEY, J.biol.Chemistry 226, 497 (1957)

57) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 177, 497, 505 (1949)

Außerdem schien das Monophosphoinositid bei der Trichloressigsäurefällung ganz oder zumindest teilweise zerstört zu werden. Um diesen Befund nachzuprüfen, extrahierten wir frische Rattenleber nach DAWSON 1953 und nach FOLCH 1957 (Methode 1a und 2) und verglichen papierchromatographisch die erhaltenen Extrakte.

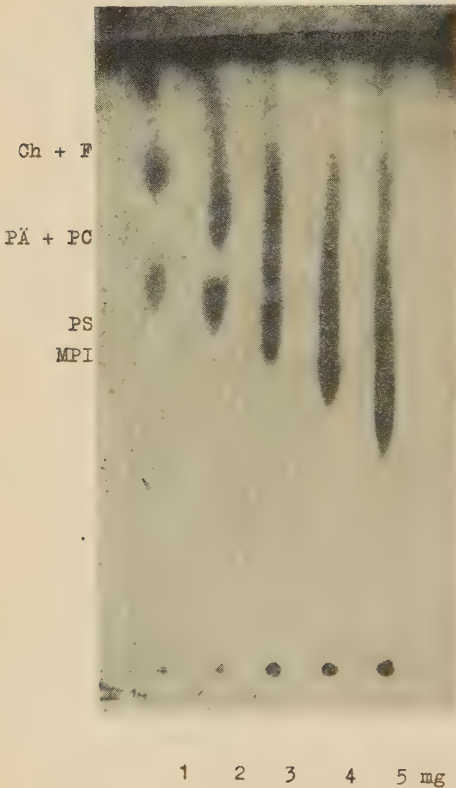
γ Zerstörung des Monophosphoinositids durch Trichloressigsäurefällung

Je 2 g frische Rattenleber wurden nach Methode 1a und 2 und nach der von uns später verwendeten Extraktionsmethode aufgearbeitet. Bei der nachfolgenden Chromatographie auf Formaldehydpapier ließen sich zwei der erhaltenen Lipoidextrakte in vier Flecke auftrennen, während bei dem Extrakt nach Trichloressigsäurefällung der dem Monophosphoinositid zuzuordnende Fleck fehlte oder nur mehr schwach sichtbar war (Abb. 2).

DAWSON chromatographiert seine Lipoidextrakte stets erst nach alkalischer Hydrolyse und konnte daher die Zerstörung des Monophosphoinositids nicht bemerken.

Für unsere Zwecke war diese Methode nicht geeignet.

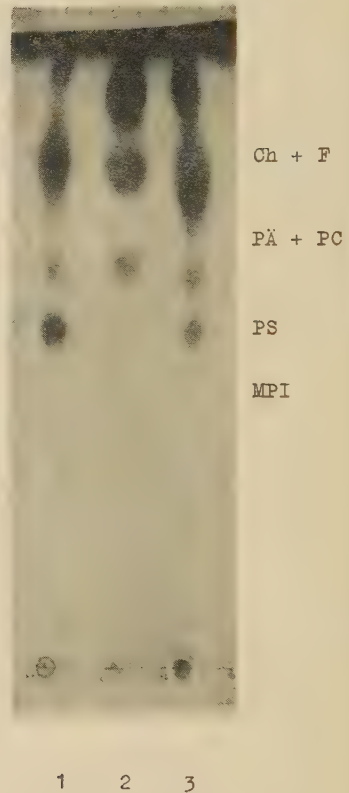
Abb. 1



Papierchromatographische Auftrennung von 1,2,3,4 und 5 mg Lipoidgesamtextrakt, hergestellt aus Rattenhirn durch Extraktion mit Chloroform-Methanol 2:1. Chromatographie auf Formaldehydpapier, B/E/W, absteigend, angefärbt mit Nilblau.

Ch+F = Cholesterin und
Neutralfette,
PÄ+PC= Phosphatidyläthanolamin und -cholin,
PS = Phosphatidylserin,
MPI = Monophosphoinositid

Abb. 2



Papierchromatogramm von 3 Rattenleberextrakten.
1: hergestellt nach eigener Methode,
2: nach DAWSON 1953,
3: nach DAWSON 1960.

Ch+F = Cholesterin und
Neutralfette,
PÄ+PC= Phosphatidyläthanolamin und -cholin,
PS = Phosphatidylserin,
MPI = Monophosphoinositid

II. Eigene Versuche zur Extraktbereitung

Wie berichtet können die präparativen Methoden zur Inositphosphatidgewinnung bei so kleinen Gewebemengen wie sie einzelne Rattenhirne darstellen nicht angewendet werden. Ebenso wenig eignen sich die von anderen Autoren zur Phosphatidanalyse im Mikromaßstab hergestellten Extrakte zur Untersuchung der Inositphosphatide, da diese teilweise zerstört werden und in jedem Fall in zu geringer Konzentration vorliegen. Deshalb mußte versucht werden, möglichst ohne Verluste einen an Inositphosphatiden angereicherten Extrakt zu erhalten.

1.) Selektive Extraktion

Um die Inositphosphatide selektiv aus dem Gehirn zu extrahieren, erprobten wir neben den gebräuchlichen Phosphatid-Lösungsmitteln Chloroform, Chloroform-Methanol (1:1 und 2:1), Äther, Petroläther und Alkohol verschiedener Konzentration auch noch Benzol, Essigester, Pyridin und Tetrachlorkohlenstoff. Alle Extraktionen wurden kalt und warm durchgeführt. Es zeigte sich aber, daß Lecithin, Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin ebenso gut oder noch besser löslich waren als die Inositphosphatide, so daß hiermit kein Erfolg erzielt werden konnte. Deshalb versuchten wir eine Anreicherung der Inositphosphatide aus einem Gesamtextrakt.

2.) Anreicherungsversuche

Ausgehend von 120 mg Lipoidgesamtextrakt verliefen Umfällungen derartig verlustreich, daß sie für diese kleinen Substanzmengen nicht weiter in Betracht gezogen wurden.

Nach einer Craig-Verteilung von 150 mg Lipoidgesamtextrakt im System Ligroin-Methanol 97% 3:2 konnten die sich in mehreren Elementen befindlichen ca. 350 γ Diphosphoinositid papierchromatographisch nicht mehr nachgewiesen werden.

Desgleichen konnte das Diphosphoinositid nach einer Auftrennung des Lipoidgesamtextraktes über eine Kieselgel (Merck 7733)-Säule nach der Methode von HANAHAN und Mit-

arbeitern⁵⁸⁾ nicht wiedergefunden werden.

Als letzte Möglichkeit inositphosphatidreiche Extrakte zu gewinnen, wendeten wir uns der fraktionierten Extraktion zu.

3.) Fraktionierte Extraktion

Zur Entfernung von Neutralfetten und Cholesterin extrahierten wir das gefriergetrocknete, homogenisierte Hirn mit wasserfreiem Aceton. Hierbei wurden aus 2 g frischem Rattenhirn 500 mg Trockensubstanz nach der Gefrietrocknung gewonnen, deren Acetonauszug an Phosphatiden nur Lecithin aber keine Inositphosphatide enthielt.

Die Extraktionen wurden papierchromatographisch verfolgt und die Nachweisempfindlichkeit der gebräuchlichen Färbemethoden durch Verwendung von ³²P-markierten Phosphatiden erheblich gesteigert. Die hierzu benützten Meßmethoden sind auf S.35 näher beschrieben.

Nachdem somit feststand, daß Aceton die Inositphosphatide nicht erfaßt, wurde allen weiteren Extraktionsversuchen eine Acetonextraktion vorausgeschickt.

Eine weitere Vorextraktion mit Äthanol wie sie von RENALL⁵⁹⁾ und auch von FOLCH⁶⁰⁾ vorgeschlagen wurde, löste bereits Inositphosphatide und kam daher nicht zur Anwendung.

Um die günstigsten Bedingungen zur Extraktion der Inositphosphatide aufzufinden, wurden mehrere Lösungsmittel und Extraktionsmethoden ausprobiert. Die erhaltenen Extrakte untersuchten wir wieder papierchromatographisch und bestimmten auch Extraktgehalt und Gehalt an organisch gebundenem Phosphor, um Rückschlüsse auf die Phosphatid- und damit auch Inositphosphatid-Konzentration ziehen zu können. Für diese Vorversuche verwendeten wir Kälberhirn. Die in nachfolgender Tabelle 1 enthaltenen Werte beziehen sich auf jeweils 10 g gefriergetrocknetes, mit Aceton vorextrahiertes und homogenisiertes Gewebe.

58) D.J.HANAHAN, J.C.DITTMER u.E.WARASHINA, J.biol.Chemistry 228, 685 (1957)

59) M.H.RENALL, Biochem. Z., 55, 296 (1913)

60) J.FOLCH, J. biol. Chemistry 146, 35 (1942)

T a b e l l e 1

Vergleichende Untersuchung verschiedener Extraktionsmittel
und -methoden

Nr.	Extraktionsmittel und -Art	Extraktgehalt in g ^x	P-Gehalt des Extraktes	
			Gesamtphosphat - anorg. Phosphat = organ. Phosphat	
			in mg	in %
1	Äther kalt, 15 x Soxhletprinzip	1.52	37.6 1.2 36.4	2.4
2	Chloroform-Methan. 2:1, kalt, 15 x Soxhletprinzip	3.63	70.0 4.8 65.2	1.8
3	Petroläther 30-60° kalt, 15 x Soxhletprinzip	1.0	28.5 2.6 25.9	2.6
4	Äther 3 Std. Soxhlet	1.44	41.9 3.7 38.2	2.65

^xAusgangsmaterial: jeweils 10 g gefriergetrocknetes Kälberhirn

Beurteilung der Ergebnisse der fraktionierten Extraktionen:
Durch eine Vorextraktion werden der Gehirn-Trockensubstanz
etwa 10% acetonlösliche Stoffe entzogen und die Inositphos-
phatide dadurch in der Hauptextraktion auf das 1.3 - 2fache
angereichert.

Bei den Hauptextraktionen liefert der Chloroform-Methanol-
Auszug zwar die größte Ausbeute an Extraktivstoffen, ent-
hält aber auch bedeutend mehr unerwünschte Begleitstoffe,
die nicht nur die Inositphosphatidkonzentration vermindern,
sondern auch die papierchromatographische Auftrennung un-

günstig beeinflussen.

Obwohl der prozentuale Gehalt an organisch gebundenem Phosphor im Petroläther-Auszug genau so hoch liegt wie in den Ätherauszügen, ist diesen jedoch der Vorzug zu geben, weil bei ihnen die Ausbeute an Extraktivstoffen - und damit an Inositphosphatiden - um 50% mehr, als beim Petroläther-Auszug beträgt.

4.) Durchführung

- a) Das Gehirn wird sofort nach Entnahme in flüssiger Luft eingefroren und dann gefriergetrocknet.
- b) Zur Zerkleinerung homogenisiert man das Gewebe unter Acetonzusatz 4 Min. bei Stufe 12 (Homogenisator der Fa. Bühler, Tübingen).
- c) Die Vorextraktion erfolgt mit 200 ml wasserfreiem, kaltem Aceton; das Homogenisat wird dazu in eine Soxhlet-hülse gegossen und mit dieser in eine Säule gebracht, in die man das Aceton tropfen läßt.
- d) Vor der Hauptextraktion wird das Gewebehomogenisat in der Soxhlet-hülse unter der Infrarotlampe getrocknet, dann drei Stunden mit wasser- und peroxydfreiem Äther im Soxhlet extrahiert.
- e) Zur papierchromatographischen Auftrennung der Inositphosphatide wird der Ätherextrakt bis auf 1 ml eingengt, ein Aliquot aufgetragen und in folgender Weise chromatographiert.

III. Papierchromatographische Auftrennung der Inositphosphatide

Mit dem von HÖRHAMMER und Mitarbeitern⁶¹⁾ entwickelten Formaldehydpapier und dem Fließmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5, Oberphase) erzielte HÖLZL⁶²⁾ nach Versuchen mit anderen Papieren und mit zahlreichen Fließmittelsystemen die beste Auftrennung. Sowohl die chromatographischen als auch die Anfärbemethoden wurden unverändert übernommen.

61) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u.G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)

62) J.HÖLZL, Dissertation München 1959

T a b e l l e 2

Papierchromatographische Färbemethoden für Phosphatide

Nr.	Reagens	reagierende Substanz	Farbe	Lit.
1	Rhodamin	Phospholipide Lysoformen	rosa Farbstoff- zerstörung	63
2	Nilblau	vor allem saure Lipoid	blau	64
3	Ninhydrin	NH ₂ enthaltende Phospha- tide	violett	65
4	Ammoniummolyb- dat-Perchlor- säure	Phosphat, anorg. und in organischer Bindung	blau	66

Bedeutend empfindlicher als die papierchromatographischen Färbemethoden ist bei Verwendung ³²P-markierter Substanzen die Messung der radioaktiven Strahlung mittels Geiger-Müller-Zählrohr. Das Chromatogramm wird hierbei mit dem Fensterzählrohrkopf abgetastet und ³²P-haltige Flecke durch ihre, vom Strahlungsmeßgerät als elektrische Impulse gezählte, β -Strahlen aufgefunden.

Sehr anschaulich erfolgt die Wiedergabe eines Papierchromatogramms mit radioaktiven Substanzen durch Anfertigung eines Autoradiogramms, die bei den schwachen Aktivitäten der Gehirn-Phosphatide allerdings etwas drei Wochen Expositionszeit erfordert. Beide Methoden sind auf Seite 35 näher beschrieben.

IV. Identifizierung der Inositphosphatide

Die Chromatographie der ätherlöslichen Inositphosphatide des Rattenhirns ergab in jedem Fall drei Flecke (siehe Abb. 7 - 10, S.43-46). Fleck I ($R_f = 0.47$, Fließmittel: Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5) entsprach auf Grund des Vergleiches mit authentischer Substanz dem Monophosphoinositid. Fleck II ($R_f = 0.41$) und III ($R_f = 0.36$) repräsentierte die Diphosphoinositid-Fraktion, die beim Rinderhirn aus drei Substanzen besteht. Nachdem schon früher von uns nachgewiesen worden war, daß die oberste Substanz der Diphosphoinositid-Fraktion Inosit enthielt, war nur noch zu

- 63) G.V.MARINETTI u. E.STOTZ, J.Amer.chem.Soc. 77, 6668 (1955)
 64) M.H.HACK, Biochem.J. 54, 602 (1953)
 65) F.CRAMEER, Papierchromatographie, Weinheim/Bergstraße, 1954
 66) C.S.HANES u. F.A.ISHERWOOD, Nature (London) 164, 1107 (1949)

klären, ob auch die anderen Verbindungen Inosit im Molekül enthalten und damit zur Diphosphoinositid-Fraktion gehören.

Im vorliegenden Fall eluierten wir daher den unteren Fleck ($R_f = 0.36$) mit Chloroform-Methanol, hydrolysierten die gewonnene Substanz mit 20n Salzsäure und trennten ihre wasserlöslichen Bausteine in den Fließmittelsystemen Isopropanol/Eisessig/Wasser 3:1:1 und Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 papierchromatographisch auf. Durch seinen $R_f = 0.35$ bzw. 0.09 konnte Inosit eindeutig identifiziert und als Bestandteil des unteren Substanzflecks nachgewiesen werden.

Im Rattenhirn sind somit mit Sicherheit drei ätherlösliche Inositphosphatide vorhanden, ein Monophosphoinositid und zwei Diphosphoinositid-Fractionen.

V. Zusammenfassung

- 1.) Die präparativen Methoden von FOLCH und von HAWTHORNE lassen sich nicht zur Gewinnung der Inositphosphatide aus einem Rattenhirn anwenden, weil durch die vielen Umfällungen zu große Verluste eintreten.
- 2.) Auch für eine Anreicherung und Reinigung der Inositphosphatide durch Gegenstromverteilung und Säulenchromatographie ist die Ausgangsmenge aus einem Rattenhirn zu gering.
- 3.) Der von anderen Autoren für Untersuchungen der Phosphatide aus ähnlichem Material ausschließlich verwendete Lipoidgesamtextrakt gestattet keinen papierchromatographischen Nachweis der Inositphosphatide, da sie in zu geringer Konzentration gegenüber den anderen Extraktbestandteilen vorliegen. Außerdem zerstört die in fast allen Vorschriften als 1.Schritt angegebene Trichloressigsäurefällung das Monophosphoinositid.
- 4.) Ebenso wenig erfolgreich verlief eine selektive Extraktion der Inositphosphatide. Sie ist auf Grund ihrer chemischen Verwandtschaft zu den unerwünschten Begleitstoffen nicht möglich.

- 5.) Die beste Lösung zur Gewinnung eines Inositphosphatid-reichen, zur papierchromatographischen Auftrennung geeigneten Extraktes ist die fraktionierte Extraktion nach Gefrier-trocknung. Die Vorextraktion erfolgt mit Aceton, der Haupt-extrakt wird durch 3stündige Ätherextraktion im Soxhlet her-gestellt.
- 6.) Zur papierchromatographischen Auftrennung der Inositphospha-tide wurde Formaldehydpapier und das Fließmittel Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5, Oberphase) genommen. Das Sichtbar-machen der Chromatogrammflecke erfolgte mit den zur Lipoid-Anfärbung gebräuchlichen Methoden.
- 7.) Radioaktive Substanzen wurden mit dem Geigerzähler lokalisiert und, soweit erforderlich, durch Anfertigung eines Autoradio-gramms sichtbar gemacht.
- 8.) Während die nach papierchromatographischer Auftrennung er-haltene Diphosphoinositid-Fraktion mit dem $R_f = 0.41$ (Fließ-mittel: Butanol/Eisessig/Wasser, 4:1:5) als das von FOLCH identifizierte "Diphosphoinositid" anzusehen ist, wurde erstmalig auch in der Fraktion mit dem $R_f = 0.36$ Inosit als Baustein nachgewiesen.

C. Quantitative Phosphatidbestimmungen

Zur qualitativen und quantitativen Analyse der Phosphatide werden die Substanzen entweder hydrolysiert und über ihre Spaltprodukte bestimmt, oder die intakten Phosphatide papierchromatographisch aufgetrennt und dann untersucht.

Die klassische Bestimmungsvorschrift, bei der die Phosphatide hydrolysiert und ihre charakteristischen Cholin- oder Inositolkomponenten quantitativ ermittelt werden, versagt allerdings, wenn der gleiche Anteil in mehr als einem Phosphatid auftritt. Liegt dagegen z.B. nur ein Inositphosphatid vor, so kann der freigesetzte Inosit nach BÖHM und RICHARZ⁶⁷⁾ maßanalytisch, nach DIXON und LIPKIN⁶⁸⁾ spektrophotometrisch und nach WOOLLEY⁶⁹⁾ mikrobiologisch bestimmt werden.

Im Gegensatz dazu trennen MARINETTI und Mitarbeiter⁷⁰⁾ die intakten Phosphatide durch Chromatographie auf Kieselsäure-imprägniertem Papier. Zur quantitativen Bestimmung werden die aufgetrennten Substanzen eluiert und aus ihrem Phosphatgehalt berechnet. Nach dieser Vorschrift kann nur Monophosphoinositid ermittelt werden, Diphosphoinositid verbleibt mit anderen unidentifizierten Substanzen am Startpunkt.

DAWSON⁷¹⁾ umgeht die Schwierigkeit einer Phosphatidtrennung dadurch, daß er durch partielle Hydrolyse zunächst Glycerolphosphorylcholin, -colamin, -serin und -inositol herstellt und den Phosphatgehalt der einzelnen Spaltprodukte nach deren Auftrennung bestimmen läßt. Ob nach dieser Methode eine Unterscheidung zwischen Lysoformen oder zwischen Mono- und Diphosphoinositid möglich ist, erscheint sehr zweifelhaft.

Da alle drei oben beschriebenen Methoden unbrauchbar sind zur Analyse eines Inositphosphatid-Gemisches, diese Analyse aber zur Durchführung vorliegender Untersuchung der

67) P.BÖHM u.G.RICHARZ, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 298, 110 (1954)

68) J.S.DIXON u.D.LIPKIN, Analytic. Chem. 26, 1092 (1954)

69) D.W.WOOLLEY, Biol. Symposia 12, 279 (1947)

70) G.V.MARINETTI, J.ERBLAND, M.ALBRECHT u. E.STOTZ, Biochim. biophysica Acta 25, 585 (1957)

71) R.M.C.DAWSON, Biochem.J. 75, 45 (1960)

^{32}P -Einbaurate in die Inositphosphatide des Rattenhirns unentbehrlich war, arbeiteten wir unter Verwendung der an unserem Institut von RICHTER⁷²⁾ entwickelten Phosphatid-Chromatographie auf Formaldehydpapier eine neue Phosphatid-Bestimmungsvorschrift aus.

Als wesentlicher Fortschritt unserer Mikromethode gegenüber den bisher zur Verfügung stehenden ist dabei anzusehen, daß mit ihr neben allen anderen Phosphatiden auch das Mono- und die Diphosphoinositide quantitativ ermittelt werden können.

Große Vorzüge unserer Methode liegen weiterhin darin, daß sie im Gegensatz zu der klassischen und der Methode von DAWSON ohne Hydrolyse und somit ohne zahlreiche, schwer zuzuordnende Spaltprodukte arbeitet, also einfacher und genauer ist. Auch verglichen mit MARINETTI'S Vorschrift weist unsere Methode Vorteile auf, da sie alle Phosphatide verlustlos erfaßt. MARINETTI läßt die Substanzen nach chromatographischer Auftrennung aus dem Papier eluieren und gewinnt nur 65 - 85% der eingesetzten Phosphatide zurück.

Um mit einer Methode a l l e Phosphatide untersuchen zu können, legten wir unserer Vorschrift die Phosphatbestimmung zu Grunde. Außerdem benötigt man den Phosphor-Gehalt der mit ^{32}P -markierten Substanzen zur Errechnung der spezifischen Aktivität.

Phosphatbestimmungen

Von den gravimetrischen, titrimetrischen, nephelometrischen, polarographischen und kolorimetrischen Methoden zur quantitativen Phosphatbestimmung wird bei der Analyse von biologischem Material ausschließlich die photometrische Messung des Phosphor-Molybdänblau-Komplexes herangezogen.

Die Phosphor-Molybdänblau-Methode

Bei Reduktion des aus Orthophosphat und Molybdänsäure gebildeten Komplexes tritt eine der Phosphatkonzentration proportionale Blaufärbung auf. Die Farbintensität dieses Phosphor-Mo-

72) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)

lybdänblau-Komplexes wird photometriert.

FISKE und SUBBAROW⁷³⁾ lieferten die erste reproduzierbare, heute noch oft verwendete Arbeitsvorschrift, die von zahlreichen Autoren modifiziert wurde. Durch Verschärfung der Reduktionsbedingungen, die bereits BERENBLUM und CHAIN⁷⁴⁾ untersucht hatten, konnte die Empfindlichkeit der Methode, die aus ihrem molaren Extinktionskoeffizienten zu ersehen ist, bedeutend erhöht werden.

Wie die nachfolgende Tabelle 3 zeigt, liegen die molaren Extinktionskoeffizienten je nach Reduktionsmittel und -temperatur zwischen 3500 und 4500 oder über 22500.

Die meisten Vorschriften zur Phosphatbestimmung enthalten keinerlei Angaben über die Empfindlichkeit ihrer Methode. Da diese aber für uns wichtig ist zur Erfassung des niedrigen Phosphorgehalts von 0.1 - 10 γ Phosphor der einzelnen papierchromatographisch aufgetrennten Inositphosphatidflecke, verglichen wir die Absorptionskurven der nach sechs verschiedenen Vorschriften hergestellten Phosphor-Molybdänblau-Komplexe (Abb. 3) und deren molare Extinktionskoeffizienten bei ihren Maxima (Tabelle 3).

73) C.H.FISKE u. Y.SUBBAROW, J.biol.Chemistry 66, 375 (1925)
74) I.BERENBLUM u. E.CHAIN, Biochem.J. 32, 286 (1938)

T a b e l l e 3

Vergleichende Untersuchung von 6 Phosphor-Molybdänblau-Methoden

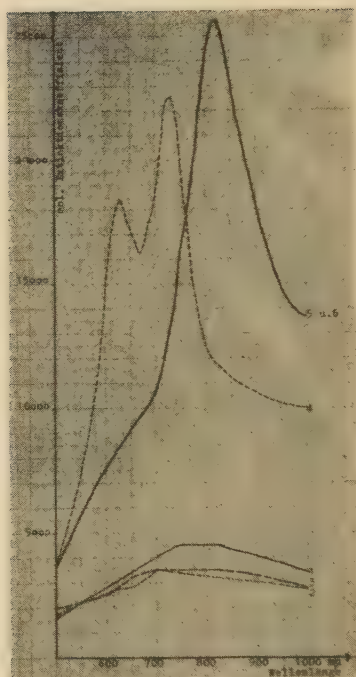
Methode	Reduktionsbedingungen		Extinktionsmessung	
	Reagens	Temp./Zeit C	Wellenlänge mμ	E mol.
FISKE u. SUBBAROW 75)	1,2,4-Aminonaphthol-sulfonsäure	20° 5 Min.	750-820	4500
EPPENDORF 76)	Metol (p-Methylaminophenol)	20° 10 Min.	700	3500
HARRIS u. POPAT 77)	Elon (p-Methylaminophenolsulfat)	20° +)	700-820	3500
MARTIN u. DOTY 78)	Stannochlorid	20° ++)	730	22500
GRISWOLD u. Mitarbeiter 79)	1,2,4-Aminonaphthol-sulfonsäure	100° 10 Min.	820	26000
LOWRY u. Mitarbeiter 80)	Ascorbinsäure	38° 2 Std.	820	26000

+) ohne Angabe; bei allen Messungen ist aber gleiche Reduktionszeit einzuhalten, mindestens 5 Min.

++) Reduktion ist sofort beendet, der Komplex bleibt über 24 Std. stabil

- 75) C.H.FISKE u. Y.SUBBAROW, J.biol.Chemistry 66, 375 (1925)
 76) Klinisch-chemische Untersuchungsmethoden mit dem Photometer EPPENDORF, Netheler u. Hinz, GmbH., Hamburg 20, 1957
 77) W.D.HARRIS u. P.POPAT, J.Amer.Oil Chemist's Soc. 31, 124 (1954)
 78) J.B.MARTIN u. D.M. DOTY, Analytic.Chem. 21, 965 (1949)
 79) B.L.GRISWOLD, F.L. HUMOLLER u. A.R.McINTYRE, Analytic.Chem. 23, 192 (1951)
 80) O.H.LOWRY, N.R. ROBERTS, K.Y.LEINER, MEI-LING WU u. A.L.FARR, J.biol.Chemistry 207, 1 (1954)

Abb. 3



Absorptionskurven der Phosphor-Molybdänblau-Komplexe
nach FISKE und SUBBAROW (1),
EPPENDORF (2),
HARRIS und POPAT (3),
MARTIN und DOTY (4),
GRISWOLD u.Mitarb. (5),
LOWRY u.Mitarbeiter(6).

Messung der Komplexe bei 1-3, 5 u. 6 in Wasser, 4 in
Benzol-Isobutanol (ZEISS-Spektralphotometer).

Beurteilung der untersuchten Methoden

Die Phosphor-Molybdänblau-Methoden lassen sich auf Grund ihrer Meßempfindlichkeit in zwei Gruppen einteilen:

Gruppe 1 mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 3500 bis 4500. Zu ihr gehören u.a. die Methoden von FISKE und SUBBAROW mit sämtlichen Modifikationen, von HARRIS und POPAT und die kombinierte Methode aus dem Vorschriftenbuch zum EPPENDORF-Photometer.

Gruppe 2 mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 22000 und höher. Hierher sind die Methoden von MARTIN und DOTY, von GRISWOLD und Mitarbeitern sowie von LOWRY und Mitarbeitern zu rechnen.

Die Methoden der zweiten Gruppe eignen sich wegen ihrer 6 bis 7mal größeren Empfindlichkeit gegenüber den Methoden der Gruppe 1 besser zur Bestimmung der geringen bei unseren Untersuchungen angefallenen Phosphatmengen.

1. Veraschung der organischen Substanz und Phosphatbestimmung

Zur Bildung des Phosphor-Molybdänblau-Komplexes muß das in den Phosphatiden organisch gebundene Phosphat mineralisiert werden.

Wir untersuchten deshalb die drei Phosphor-Molybdänblau-Methoden mit dem höheren Extinktionskoeffizienten in Zusammenhang mit der Veraschung der auf dem Papierchromatogramm befindlichen Inositphosphatide.

1.) Veraschung der Inositphosphatide nach Elution aus dem Papier

Nach MARINETTI und Mitarbeitern⁸¹⁾ werden die Phosphatide durch 10 minütiges Kochen am Rückflußkühler mit Chloroform-Methanol 1:1 aus dem Papier eluiert. Dabei mußten wir feststellen, daß sich die Inositphosphatide nicht mehr quantitativ aus unserem Formaldehydpapier herauslösen lassen, auch nicht durch längere Extraktion.

⁸¹⁾ G.V.MARINETTI, J.ERBLAND, M.ALBRECHT u. E.STOTZ, Biochim. biophysica Acta 25, 585 (1957)

Um Substanzverluste zu vermeiden, veraschten wir das Phosphatid zusammen mit dem Chromatogrammpapier.

2.) Veraschung der Inositphosphatidflecke des Papierchromatogramms

Die nasse Veraschung von 20 - 100 mg Papier geschah durch Erhitzen mit Nitriersäure, mit verschiedenen Schwefelsäure-Perchlorsäure-Mischungen und mit 72%iger Perchlorsäure, jeweils auch unter Zusatz von konz. Wasserstoffperoxyd. Nach beendeter Veraschung wurde die stark saure Lösung neutralisiert und durch erneutes Ansäuern auf die zur Phosphatbestimmung erforderliche Konzentration von 1n gebracht.

Da die Phosphatmenge pro Inositphosphatidfleck auch dann noch zu niedrig ist, reduzierten wir das Reaktionsvolumen zur Erhöhung der Extinktion auf 3 ml, das Volumen der von uns benutzten Küvetten des ZEISS-Spektralphotometers.

Bei Verwendung von Perchlorsäure konnten wir dieses Volumen einhalten, da bereits 0.5 ml von ihr zur Veraschung von 100 mg Papier ausreichen. Die resultierende Lösung verbrauchte zur Neutralisation 3.28 ml n Natronlauge, hätte also mit Wasser auf 3.3 ml aufgefüllt, die zur Bildung des Phosphor-Molybdänsäure-Komplexes notwendige Säurekonzentration von 1n erreicht.

Die anderen Veraschungssäuren sind in ihrer oxydierenden Wirkung der 72%iger Perchlorsäure weit unterlegen und müssen zur Veraschung der gleichen Papiermenge in doppelter bis vierfacher Menge angewendet werden. Bei der nachfolgenden Neutralisation können die kleinen Volumina der Perchlorsäure-Methode nicht eingehalten werden.

II. Phosphatbestimmung nach Perchlorsäure-Veraschung

Durch die Verwendung von Perchlorsäure zur Veraschung der organischen Substanz scheiden zwei der drei ausgewählten Methoden bereits aus. Stannochlorid, das Reduktionsmittel von MARTIN

und DOTY verträgt sich nach Untersuchungen von HARRIS und POPAT⁸²⁾ und nach eigenen Feststellungen nicht mit Perchlorsäure.

Ebenso stört Perchlorsäure die Phosphatbestimmung nach B.GRISWOLD, da sie die bei 100° durchgeführte Reduktion des Phosphor-Molybdänsäure-Komplexes verhindert.

Die bei 38° vorgenommene Reduktion mit Ascorbinsäure nach LOWRY und Mitarbeitern⁸³⁾ verläuft auch in Gegenwart von Perchlorsäure ungestört. Wir verwendeten deshalb zur Bestimmung der Inositphosphatide des Rattenhirns diese Methode.

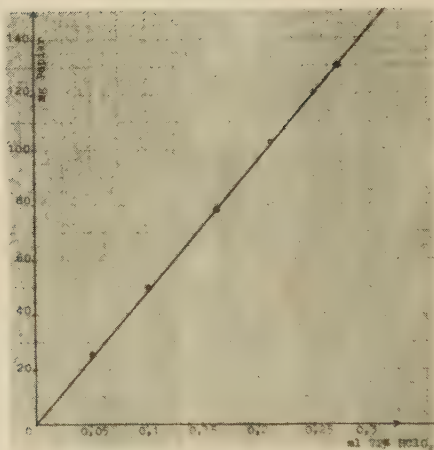
III. Durchführung der Phosphatidbestimmungen

1.) Veraschungsbedingungen

Gleichbleibende Veraschungsbedingungen erreichten wir durch Verwendung eines elektrisch beheizten Aluminiumblockes, in dessen schräge Bohrungen von 20 mm Durchmesser und 25 mm Tiefe JENAer FIOLAX-Reagensgläser mit dem zu veraschenden Papier und der erforderlichen Perchlorsäuremenge eingesetzt wurden. Die Temperatur wurde innerhalb von 2 Stunden auf 180° gesteigert und dann eine weitere Stunde beibehalten. Zur Kontrolle titrierten wir nach beendeter Veraschung die unverbrauchte Perchlorsäure zurück, wobei wir zeigen konnten, daß der Säureverbrauch dem Papiergewicht genau proportional ist (Abb. 4). Um eine klare Lösung zu erhalten, muß die eingesetzte Perchlorsäuremenge mindestens doppelt so groß sein wie die bei der Veraschung des entsprechenden Papiergewichts tatsächlich verbrauchte Menge.

82) W.D.HARRIS u. P.POPAT, J.Amer.Oil Chemist's Soc. 31, 124 (1954)
83) O.H.LOWRY, N.R.ROBERTS, K.Y.LEINER, MEI-LING Wu u. A.L.FARR, J.biol.Chemistry 207, 1 (1954)

Abb. 4



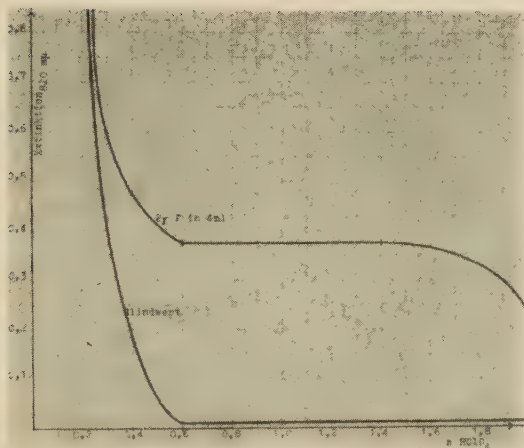
Verbrauch an 72%iger Perchlorsäure bei der Veraschung von 0 - 140 mg Chromatogrammpapier.

2.) Reduktionsbedingungen

Nach der Vorschrift von LOWRY und Mitarbeitern soll die Ammoniummolybdat-Konzentration der Reaktionslösung 0.25%ig, die Konzentration der Ascorbinsäure 1%ig sein.

Diese Bedingungen sind leicht einzuhalten, dagegen ist es schwierig, nach der Veraschung die geforderte Säurekonzentration von 1n in 3 ml zu erreichen. Wir prüften deshalb nach, in welchem Säurekonzentrationsbereich die Entwicklung des Phosphor-Molybdänsäure-Komplexes verläuft und fanden, daß in einer 0.6 - 1.4 normalen Perchlorsäurelösung die Extinktion bei 820 m μ für 2 γ P in 4 ml Lösung gleichbleibend 0.375 beträgt (Abb. 5).

Abb. 5



Einfluß der Perchlorsäure-Konzentration auf die Entwicklung des Molybdänblau- und Phosphor-Molybdänblau-Komplexes bei der Methode nach LOWRY und Mitarbeitern.

3.) Durchführung der Phosphatbestimmung

Die beschriebenen vergleichenden Untersuchungen der Empfindlichkeit einiger Phosphor-Molybdänblau-Methoden, der Veraschungsbedingungen in Zusammenhang mit den ausgewählten Methoden, sowie der Reduktionsbedingungen und die Normierung der Veraschung führten zu folgendem Arbeitsgang:

Veraschung: Die Chromatogrammflecke, die 0.1 - 10 γ P in 0 - 90 mg Papier enthalten, werden ausgeschnitten, gewogen, zerschnitten und in ein JENAer FIOLAX-Reagensglas (18 x 180 mm) unter Zusatz von 0.4 ml 72%iger, mit Ammoniummolybdat als Katalysator gesättigter, Perchlorsäure p.A. gegeben.

Die Reagensgläser werden dann im Aluminiumblock innerhalb von 2 Stunden auf 180° erhitzt und 1 Stunde bei dieser

Temperatur belassen.

Nach dem Abkühlen werden 2 ml Wasser zugefügt und zur Umwandlung des bei der Veraschung gebildeten Metaphosphats in Orthophosphat 10 Min. in ein kochendes Wasserbad gestellt und wieder abgekühlt.

Phosphatbestimmung: Zu der Phosphatlösung werden 0.3 ml 2.5%ige Ammoniummolybdatlösung und dann 0.3 ml 10%ige Ascorbinsäure gegeben und 2 Std. bei 38° inkubiert.

Extinktionsmessung: Der Phosphor-Molybdänblau-Komplex wird im ZEISS-Spektralphotometer bei 820 mμ unter Verwendung von 1 cm-Küvetten gemessen.

Blindwert: Die Extinktionsmessung erfolgt gegen einen Blindwert, der völlig parallel ermittelt wird, nur ohne Substanz.

Papier-Blindwert: Von dem gleichen Chromatogramm wird ein Stück das außerhalb der chromatographierten Fläche liegt parallel verarbeitet, die gefundene Extinktion pro mg Papier mit dem Gewicht (in mg) der Untersuchungsprobe multipliziert und die somit ermittelte Extinktion des Papiers (=Papier-Blindwert) von der Extinktion der Untersuchungsprobe abgezogen.

Eichwert: Zu jeder Bestimmungsserie werden zwei Eichwerte mit 1 und 2 γ Phosphor im Parallelversuch gemessen.

Berechnung:

$$P \gamma = \frac{\text{Extinktion der untersuchten Probe}}{\text{Extinktion 1 } \gamma \text{ P (Eichwert)}}$$

4.) Berechnungsgrundlage der Phosphatide über ihren Phosphorwert

Aus dem Verhältnis von Molekulargewicht der einzelnen Substanzen zu ihrem Phosphoranteil ergeben sich folgende Umrechnungsfaktoren:

T a b e l l e 4

Substanz	Mol.Gew.	Mol.Gew.des P-Anteils	Umrechnungs- faktor
Lecithin	800	31	25.8
Phosphatidyläthanol- amin	733	31	24.6
Phosphatidylserin	790	31	25.5
Monophosphoinositid	863	31	27.8
Diphosphoinositid	850	62	13.7

IV. Zusammensetzung der ätherlöslichen Phosphatidfraktion des Rattenhirns

Rattenhirn wurde gefriergetrocknet, homogenisiert, mit Aceton vorextrahiert und dann zwei Stunden mit Äther im Soxhlet ausgezogen. Der Ätherextrakt wurde auf 1 ml eingengt, ein Aliquot durch Chromatographie auf Formaldehydpapier aufgetrennt und die Zusammensetzung seiner Phosphatidfraktion über den Phosphorwert der einzelnen Flecke ermittelt.

Die Gehirne stammten von ausgewachsenen, männlichen Albinoratten von 250 - 290 g Gewicht und wogen nach der Gefrier-trocknung durchschnittlich 500 mg.

Von zwei Rattenhirnen wurden die gesamten Phosphatide, von drei weiteren nur die Inositphosphatide, analysiert.

T a b e l l e 5

Gehalt des Rattenhirn-Ätherextraktes an den verschiedenen Phosphatiden und deren prozentualer Extrakt-Anteil

Rattenhirn-Ätherextrakt			Phosphatidgehalt	
Nr.	mg	Substanz	mg ⁺	%
1	35.7	MPI	1.02	2.86
		DPI 1	0.154	0.43
		DPI 2	0.194	0.56
2	34.7	MPI	0.93	2.68
		DPI 1	0.104	0.3
		DPI 2	0.194	0.56
3	53.3	PC und PÄ	20.7	38.8
		PS	4.63	8.7
		MPI	1.18	2.22
		DPI 1	0.196	0.37
		DPI 2	0.183	0.34
4	36.1	PC und PÄ	13.85	38.4
		PS	3.49	9.7
		MPI	0.85	2.35
		DPI 1	0.166	0.46
		DPI 2	0.163	0.45
5	43.5	MPI	1.29	2.97
		DPI 1	0.243	0.56
		DPI 2	0.237	0.54

+ = Mittelwerte aus mehreren Bestimmungsreihen

PC	(=Phosphatidylcholin)	} 13.9 - 20.7 mg	38.4 - 38.8 %
PÄ	(=Phosphatidyläthanolamin)		
PS	(=Phosphatidylserin)		
MPI	(=Monophosphoinositid)		
DPI 1	(=Diphosphoinositid 1)		
DPI 2	(=Diphosphoinositid 2)	0.16- 0.24mg	0.34- 0.56%
		0.10- 0.24mg	0.30- 0.56%
		0.85- 1.29mg	2.22- 2.97%
		3.5 - 4.63mg	8.7 - 9.7 %

V. Diskussion der neuen Phosphatidbestimmungsmethode und Vergleich mit den bisherigen Methoden

Die ausgearbeitete Methode zur Phosphatidbestimmung, die eine rasche Analyse der Phosphatide auch kleinster Gewebemengen ermöglicht, bedeutet eine wesentliche Verbesserung der bisher verwendeten Analysenmethoden. Mit dieser Vorschrift war es möglich, eine quantitative Bestimmung von drei im gleichen Gewebe, in einer Konzentration von 0.3% vorkommenden Inositphosphatiden reproduzierbar durchzuführen.

Während nach unserer Methode die Inositphosphatid-Fraktion des Rattenhirns papierchromatographisch in drei Substanzflecke aufgetrennt werden kann und diese verlustlos durch direkte Veraschung des Papiers mit der Substanz erfaßt werden, ist es nach der Vorschrift von MARINETTI nicht möglich, die Diphosphoinositide zu untersuchen, da diese bei Chromatographie auf Kieselsäure-imprägnierten Papier unaufgetrennt mit anderen unidentifizierten Substanzen am Startpunkt verbleiben. Aber auch bei der Bestimmung der anderen Phosphatide treten Schwierigkeiten auf, da sich die einzelnen Verbindungen nach HOKIN⁸⁴⁾, der diese Methode mangels einer besseren trotzdem verwendet, nur zu 65 - 85% wieder aus dem Papier eluieren lassen. Von einem Inositphosphatid wurden sogar nur 35% wiedergefunden.

DAWSON erhält bei partieller Hydrolyse zahlreiche Spaltprodukte, so zum Beispiel Polyglyzerolphosphatid, Phosphatidsäure, Glycerinphosphorsäure, anorganisches Phosphat u.a., die keinem der Phosphatide eindeutig zugeordnet werden können. Außerdem bleiben 0.5 - 7.9% Phospholipide, die bei den angewendeten Bedingungen nicht hydrolysiert werden, zurück. Die Ergebnisse, die mit der Methode von DAWSON gefunden werden, sind daher immer zu niedrig und ungenau. Die Methode ist darüberhinaus nur begrenzt anwendbar, da die Analyse von Lysoverbindungen oder von mehreren nebeneinander vorkommenden Inositphosphatiden wegen der gleichartigen Spaltprodukte die diese liefern, nicht möglich ist. Der Vorteil unserer Methode demgegenüber ist die Bestimmung der in-

84) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, J.biol.Chemistry 233, 805 (1958)

takten Phosphatide, die alle eindeutig identifiziert und 100%ig erfaßt werden. Außerdem ist unsere Vorschrift schneller und einfacher durchzuführen, da keine Hydrolysen erforderlich sind.

Auch gegenüber der Phosphatidanalyse über den Cholin-, Äthanolamin-, Serin- und Inositanteil bietet unsere Methode Vorteile, indem sie die vier Bestimmungsvorschriften für die verschiedenen Komponenten durch eine einzige, die Phosphatidbestimmung, ersetzt und dadurch bei wesentlicher Arbeitsvereinfachung besser vergleichbare Werte liefert. Daß durch Hydrolyse der Substanz, die natürlich der Cholin- oder Inositbestimmung vorausgehen muß, der Nachweis verschiedener Phosphatide mit gleicher Cholin- oder Inositskomponente unmöglich wird, erwähnten wir bereits bei der Methode nach DAWSON.

D. Einbau von ^{32}P in die ätherlöslichen Inositphosphatide des Rattenhirns

I. Markierung der Inositphosphatide mit ^{32}P in vivo

Den Ratten wurde der trägerfreie ^{32}P als wässrige Na_2HPO_4 -Lösung subcutan in die Innenseiten der hinteren Extremitäten eingespritzt. Die Versuchstiere im Gewicht vom 250 - 290 g erhielten 1 mC oder $3 \times 0.35 \text{ mC } ^{32}\text{P}$. Der Einbau in die Inositphosphatide des Rattenhirns geschieht sehr rasch und kann bereits nach zwei Stunden gemessen werden, während z.B. das Phosphatidylserin desselben Organs nach zwei Stunden noch keine Radioaktivität aufweist (siehe Abb. 7, S. 43).

II. Messung der Radioaktivität

Bei Aktivitätsmessungen unterscheidet man zwischen Absolut- und Relativbestimmungen.

Die absolute Aktivität gibt an, wieviele Zerfälle je Zeiteinheit in der Meßprobe stattfinden, ihre Dimension ist das Curie (C). $1 \text{ C} = 3.7 \cdot 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde.

Da die tatsächliche Anzahl der Zerfälle schwierig zu messen und auch ohne Bedeutung in der Indikatoranalyse ist, erfolgt hier mittels Strahlungsmeßgerät die Bestimmung der relativen Aktivität, deren Einheit die von der jeweiligen Meßanordnung abhängige Anzahl der registrierten Impulse pro Zeiteinheit ist. Eine wichtige Charakteristik radioaktiver Substanzen ist ihre spezifische Aktivität, die den markierten Anteil - gemessen in Impulsen/Minute - der Gesamtsubstanz anzeigt.

$$\text{z.B.: Spezifische Aktivität} = \frac{^{32}\text{P (Imp./Min.)}}{\text{P in } \gamma}$$

1.) Aktivitätsmessung mittels Strahlungsmeßgerät

Zur Messung der relativen Aktivität von ^{32}P verwendeten wir den Digitalen Strahlungsmeßplatz MS Str. 610/1

mit einem Methandurchflußzähler MS MD 632/1 und einem Geiger-Müller-Fensterzählrohrkopf Typ MS GM 592/1 der Firma TELEFUNKEN.

Da die Halbwertszeit von ^{32}P nur 14 Tage beträgt, macht sich die Aktivitätsabnahme bereits innerhalb einer Untersuchungsreihe stark bemerkbar. Alle Meßwerte wurden deshalb mit Hilfe eines Standards auf die Anfangsaktivität umgerechnet.

Genauigkeit der Methode

Die Genauigkeit der Messung hängt von der Impulszahl ab und wird durch den mittleren statistischen Fehler ausgedrückt. Da bei Aktivitätsmessungen die Werte einer POISSON-Verteilung gehorchen, ist der mittlere Fehler durch die Gleichung

$$m = \pm \sqrt{N}$$

gegeben, wobei m = mittlerer Fehler und N das arithmetische Mittel der Messungen bedeuten.

In Prozent ausgedrückt:

$$m_{\text{rel}} = \pm \frac{100}{\sqrt{N}} \%$$

Bei einer Impulszahl von 25 würde der mittlere Fehler der Messung demnach $\pm 20\%$ betragen, bei 2500 nur $\pm 2\%$.

Zur Erreichung hoher Impulszahlen mit entsprechend geringer Fehlerbreite benötigen deshalb schwach radioaktive Präparate eine lange Meßzeit. Da es sich bei den Diphosphoinositiden des Rattenhirns um die Messung von Mikromengen handelte, führten wir eine "Messung" von 3 Wochen durch, indem wir ein Autoradiogramm anfertigten.

2.) Aktivitätsmessung mittels Autoradiographie

Die von radioaktiven Substanzen emittierten Strahlen schwärzen die Bromsilberkörner einer photographischen Emulsion. Intensität und Ausdehnung dieser diffusen Schwärzung entsprechen der Aktivität der Meßprobe und können quantitativ ausgewertet werden.

Zur Anfertigung einer Autoradiographie wird das die markierten Substanzen enthaltende Chromatogramm auf Röntgenfilm gelegt und dieser nach einer Expositionszeit von 10 - 20 Tagen entwickelt. Die auf dem Film sichtbaren hell- bis dunkelgrauen Flecke entsprechen in ihrer Lage den Chromatogrammflecken und in ihrer Tönung deren Aktivität.

Größe und Schwärzungsgrad der Autoradiogrammflecke wurden durch den ELPHOR-INTEGRAPH der Firma Dr. Bender u. Dr. Hobein in eine Extinktionskurve übertragen, ein Originalmuster ist in Abbildung 6 enthalten. Die von dem Gerät außerdem angezeigten Flächenwerte der einzelnen Fraktionen geben die relative Aktivität an.

Autoradiogramm-Muster mit dazugehörigem
Elphor-Meßstreifen befinden sich im
Original der Dissertation

Abb. 6: Muster für die quant. Auswertung eines Autoradiogramms
mittels Elphor-Integrator.

links: Autoradiographie von 2 mg papierchromatographisch aufgetrenn-
tem Rattenhirn-Ätherextrakt nach 16-stündiger ^{32}P -Inkubation in vivo.
1 = Lecithin und Phosphatidyläthanolamin (nicht aufgetrennt), 2 =
Phosphatidylserin, 3 = Monophosphoinositid, 4 = Diphosphoinositid 1,
5 = Diphosphoinositid 2. - Chromatographie auf Formaldehydpapier,
B/E/W 4:1:5, absteigend, Autoradiographie auf PERUTZ PER-X-Röntgen-
film, Expositionszeit 20 Tage.

rechts: Extinktionskurve gemessen im ELPHOR-INTEGRATOR, Filter: 546 m μ
Spaltbreite 1 x 21 mm. Die Flächenwerte geben die relative Aktivität
an.

III. Ergebnisse der Untersuchungen mittels ^{32}P

Bei der Untersuchung des ^{32}P -Einbaus in die Inositphosphatide des Rattenhirns wurden die Versuchstiere 2, 4, 8, 16 und 32 Stunden nach der ^{32}P -Einspritzung getötet, ihr Gehirn entnommen, nach der Beschreibung auf S. 16 aufgearbeitet und die Verteilung des ^{32}P in den verschiedenen Gehirnextrakten und - nach deren papierchromatographischer Auftrennung - in den einzelnen Phosphatiden verfolgt.

1.) Spezifische Aktivität der Rattenhirne und der aus ihnen hergestellten Extrakte nach verschieden langem ^{32}P -Einbau

Um die weitere Analyse der Phosphatide zu ermöglichen, mußten sie in einer Fraktion angereichert werden. Das Rattenhirn wurde deshalb zunächst mit Aceton vorextrahiert, dann erfolgte die Hauptextraktion mit Äther. Wie aus nachfolgender Tabelle ersichtlich ist, weist der Ätherextrakt die höchste spezifische Aktivität auf, enthält also die meisten markierten Substanzen. Die in der Tabelle 6 aufgeführte Chloroform-Methanol-Nachextraktion dient nur zum Vergleich und zur Kontrolle, ob die Inositphosphatide quantitativ im Ätherextrakt erfaßt worden sind, wie papierchromatographisch geprüft wurde.

T a b e l l e 6

Spezifische Aktivität von Rattenhirn und den aus ihm hergestellten Vor-, Haupt- und Nachextrakten nach 2 - 32-stündigem ^{32}P -Einbau

Spezifische Aktivität (Imp./Min./mg Substanz)					
Substanz	Dauer des ^{32}P -Einbaus in Std.				
	2	4	8	16	32
Rattenhirn-Homogenisat	1160	2246	1780	2572	3413
Vorextrakt: Aceton	42	147	173	606	965
Hauptextrakt: Äther	1687	2940	2550	2920	6010
Nachextrakt: Chloroform-Methanol	321	789	538	847	1620

2.) Spezifische Aktivität der Phosphatide des Rattenhirn-Ätherextrakts nach verschieden langem ³²P-Einbau

Bei der papierchromatographischen Auftrennung des Rattenhirn-Ätherextrakts wurden acht radioaktive Flecke aufgefunden, von denen sich fünf mit Nilblau anfärben ließen. Diese fünf Phosphatide wurden durch Vergleich mit Reinsubstanzen (Abb. 7 - 10) identifiziert:

Fleck 1 ($R_F = 0.68$) entspricht Lecithin und Phosphatidyl-äthanolamin, die sich mit dem für die Auftrennung der Inositphosphatide ausgewählten Verfahren nicht trennen lassen. Phosphatidsäure würde ebenfalls in diesem Fleck sitzen.

Fleck 2 ($R_F = 0.55$) ist dem Phosphatidylserin zuzuordnen.

Fleck 3 ($R_F = 0.47$) wurde als Monophosphoinositid identifiziert.

Fleck 4 ($R_F = 0.41$) zeigt die gleiche Laufhöhe wie der oberste Fleck eines aus Rinderhirn isolierten Diphosphoinositids und wird im Folgenden Diphosphoinositid 1 genannt.

Fleck 5 ($R_F = 0.36$) wird Diphosphoinositid 2 genannt, da er sich mit dem zweitobersten Fleck der aus Rinderhirn isolierten Substanz deckt.

Die Flecken 6 ($R_F = 0.17$), 7 ($R_F = 0.13$) und 8 ($R_F = 0.02$) lassen sich nicht mit Nilblau anfärben, geben eine starke Phosphatreaktion und werden beim Wässern des Chromatogramms restlos ausgewaschen. Es handelt sich um Glyzerinphosphat, anorganisches Phosphat und um eine unidentifizierte Substanz.

Da die Phosphatide zur Sichtbarmachung mit Nilblau angefärbt und dann gewässert wurden, prüften wir ihre "Auswaschbarkeit" und fanden auch nach 32-stündigem Wässern die eingesetzten Substanzmengen zu 100% wieder.

a) Messung der spezifischen Aktivität mittels Strahlungs-
meßgerät

Die durch Chromatographie eines Rattenhirn-Äther-extraktes aufgetrennten fünf Phosphatidflecke - untersucht nach verschieden langem ^{32}P -Einbau - wiesen sehr unterschiedliche spezifische Aktivitäten auf, wie die nachfolgende Tabelle 7 zeigt:

T a b e l l e 7

Spezifische Aktivität von Rattenhirn-Phosphatiden nach 2 - 32-stündigem ^{32}P -Einbau

Spezifische Aktivität (Imp./Min./ γ P)						
Nr. des Flecks	Substanz	Dauer des ^{32}P -Einbaus in Std.				
		2	4	8	16	32
1	Lecithin u. Phosphatidyläthanolamin	6	18	37	61	128
2	Phosphatidylserin	-	6	26	22	59
3	Monophosphoinositid	84	150	179	207	268
4	Diphosphoinositid 1	159	213	283	265	380
5	Diphosphoinositid 2	89	248	247	334	455

Der ^{32}P -Umsatz von Lecithin, Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin geht im Rattenhirn sehr langsam vor sich und kann nach 2stündigem Einbau noch nicht gemessen werden, während die Inositphosphatide nach der gleichen Zeit bereits hoch markiert sind. Besonders auffallend ist die hohe spezifische Aktivität des Diphosphoinositid 1, die das Doppelte der spezifischen Aktivitäten der anderen beiden Inositphosphatide beträgt.

Auch nach längeren Einbauzeiten behaupten die Inositphosphatide ihre Sonderstellung; wird die spezifische Aktivität von Phosphatidylserin mit 1 angenommen, so wäre nach 32 Stunden ein Verhältnis der spezifischen Aktivität von: Phosphatidyl-

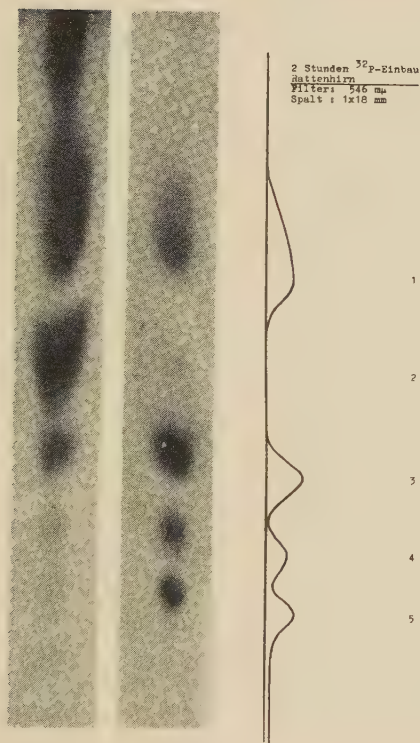
serin : -Äthanolamin/cholin : Monophosphoinositid :
Diphosphoinositid 1 : Diphosphoinositid 2 = 1:2:4:6:8
vorhanden.

b) Ermittlung der Spezifischen Aktivität durch Autoradio-
graphie

Beim qualitativen Nachweis der radioaktiven Substanzen im Ätherextrakt des Rattenhirns zeigten sich nach papierchromatographischer Auftrennung und Autoradiographie die relativen Aktivitäten in Schwärzungsfläche und -grad der photographischen Emulsion. Die Flächenwerte der Extinktionskurve verhalten sich zueinander wie die im Strahlungsmessplatz gezählten Impulse. Zur quantitativen Auswertung berechneten wir die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Substanzen aus ihrem Flächenwert pro γ Phosphor. (siehe Tabelle 8, Seite 47).

Die folgenden Abbildungen 7 - 10 veranschaulichen durch die zum Autoradiogramm gehörende Extinktionskurve die quantitative Verteilung von ^{32}P in den Phosphatiden des Rattenhirn-Ätherextraktes nach verschieden langen Einbauzeiten. Zu jeder Abbildung sind die Flächenwerte der einzelnen Substanzen angegeben und ihr prozentualer Anteil am Phosphatid- ^{32}P .

Abb. 7



Links: Papierchromatographisch aufgetrennter Ätherextrakt des Rattenhirns; Formaldehydpapier, B/E/W, 4:1:5, absteigend.

Mitte: Autoradiogramm eines nach 2stündigem ³²P-Einbau hergestellten Ätherextrakts; PERUTZ PER-X-Film, Expositionszeit 20 Tage.

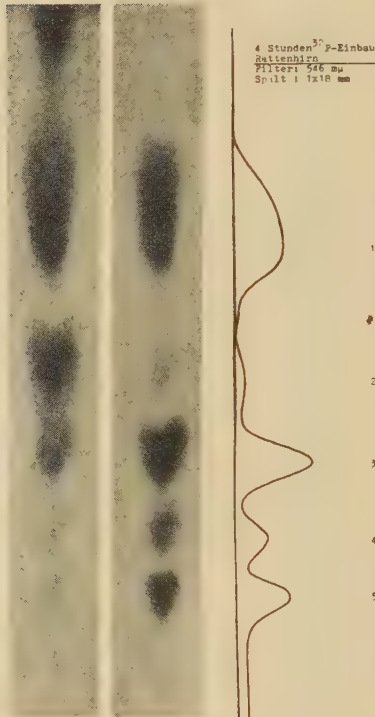
Rechts: Extinktionskurve des Autoradiogramms; Filter 546 mμ, Spalt 1 x 18 mm.

1 = Phosphatidyläthanolamin und Lecithin; 2 = Phosphatidylserin;
3 = Monophosphoinositid; 4 = Diphosphoinositid; 5 = Diphosphoinositid 2;

Flächenwerte:	Fleck 1	4.09	= 43.9 %
	2	—	= 0.0 %
	3	2.43	= 26.1 %
	4	1.26	= 13.55 %
	5	1.53	= 16.45 %

Phosphatid-Fraktion 9.31 = 100 %

Abb. 8



Links: Chromatogrammbild

Mitte: Autoradiogramm

Rechts: Extinktionskurve zum Autoradiogramm
eines nach 4stündigem ^{32}P -Einbau her-
gestellten Rattenhirn-Ätherextraktes.

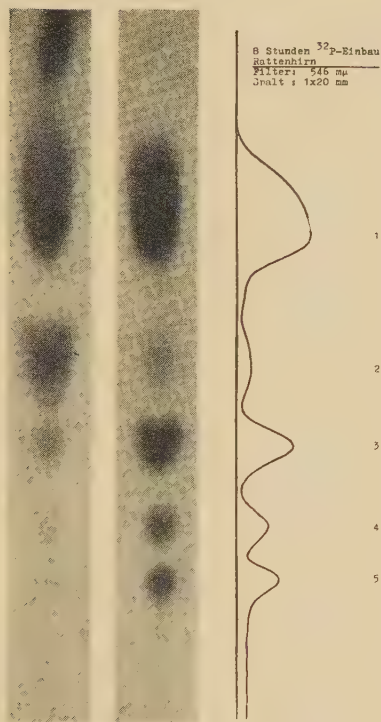
Alle Versuchsbedingungen wie bei Abb. 7.

1 = Lecithin und Phosphatidyläthanolamin; 2 = Phosphatidylserin;
3 = Monophosphoinositid; 4 = Diphosphoinositid 1; 5 = Diphospho-
inositid 2.

Flächenwerte: Fleck 1	8.27	=	42.0 %
2	0.75	=	3.8 %
3	5.15	=	26.2 %
4	2.07	=	10.5 %
5	3.43	=	17.5 %

Phosphatidfraction 19.67 = 100 %

Abb. 9



Links: Chromatogrammbild

Mitte: Autoradiogramm

Rechts: Extinktionskurve zum Autoradiogramm
eines nach 8stündigem ^{32}P -Einbau her-
gestellten Rattenhirn-Ätherextrakts.

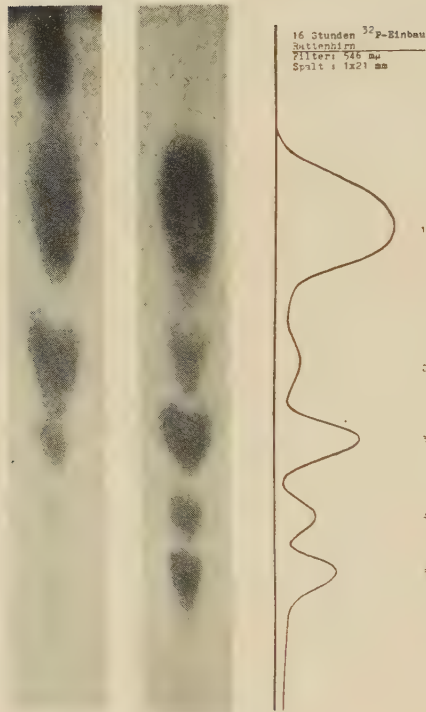
Alle Versuchsbedingungen wie bei Abb. 7,
Spaltbreit 1 x 20 mm.

1 = Lecithin und Phosphatidyläthanolamin; 2 = Phosphatidylserin;
3 = Monophosphoinositid; 4 = Diphosphoinositid 1; 5 = Diphospho-
inositid 2

Flächenwerte: Fleck 1	10.04	= 57.9 %
2	0.85	= 4.9 %
3	3.15	= 18.3 %
4	1.47	= 8.5 %
5	1.8	= 10.4 %

Phosphatidfraktion 18.31 = 100 %

Abb. 10



Links: Chromatogrammbild

Mitte: Autoradiogramm

Rechts: Extinktionskurve des Autoradiogramms
eines nach 16stündigem ^{32}P -Einbau her-
gestellten Rattenshirn-Ätherextrakts.

Spaltbreite bei der Extinktionsmessung 1 x 21 mm,
sonst alle Versuchsbedingungen wie bei Abb. 7.

1 = Lecithin und Phosphatidyläthanolamin; 2 = Phosphatidylserin;
3 = Monophosphoinositid; 4 = Diphosphoinositid 1; 5 = Diphospho-
inositid 2

Flächenwerte: Fleck	1	17.68	=	59.4 %
	2	1.73	=	5.8 %
	3	5.03	=	16.9 %
	4	1.92	=	6.4 %
	5	3.43	=	11.5 %

Phosphatidfraction	29.79	=	100 %
--------------------	-------	---	-------

Berechnung der Spezifischen Aktivität: Nach Bestimmung der Phosphorwerte der chromatographisch getrennten Inositphosphatide wurden aus den gefundenen Flächenwerten der Extinktionskurven die spezifischen Aktivitäten ermittelt (Tabelle 8).

T a b e l l e 8

Spezifische Aktivität der 3 Inositphosphatide des Rattenhirns
nach 2 - 32stündigem ^{32}P -Einbau

^{32}P -Einbau in Std.	Fleck	Substanz	FW-Messung		Phosphor in γ	Spezifische Aktivität (FW/ γ P)
			Spalt mm	FW		
2	3	MPI	1x18	2.43	2.12	1.15
	4	DPI 1		1.26	0.64	1.97
	5	DPI 2		1.53	1.12	1.37
4	3	MPI	1x18	5.15	2.08	2.48
	4	DPI 1		2.07	0.48	4.3
	5	DPI 2		3.43	0.8	4.3
8	3	MPI	1x20	3.15	1.76	1.79
	4	DPI 1		1.47	0.6	2.45
	5	DPI 2		1.8	0.64	2.81
16	3	MPI	1x21	5.03	1.84	2.74
	4	DPI 1		1.92	0.8	2.4
	5	DPI 2		3.43	0.88	3.9
32	3	MPI	1x23	13.0	2.7	4.82
	4	DPI 1		6.4	1.12	5.7
	5	DPI 2		8.53	1.08	7.9

MPI = Monophosphoinositid

DPI = Diphosphoinositid

FW = Flächenwert

Es lassen sich nur solche spezifischen Aktivitäten (FW/ γ P) untereinander vergleichen, deren zugehöriger Flächenwert mit der gleichen Spaltbreite gemessen wurde, also nur die Werte jeweils eines Autoradiogramms, weiterhin noch die Werte nach 2- und nach 4-stündigem ^{32}P -Einbau vorstehender Tabelle (Seite 47).

Übereinstimmend mit den aus Impulszahl pro Minute pro γ Phosphor ermittelten spezifischen Aktivitäten gelangen wir wieder zu dem Ergebnis, daß der ^{32}P -Umsatz in den Diphosphoinositiden größer ist als im Monophosphoinositid, und daß nach 2stündiger Einbauzeit die spezifische Aktivität des Diphosphoinositid 1 auffallend über den spezifischen Aktivitäten der beiden anderen Inositphosphatide liegt. Nach längerer Einbauzeit - 8, 16 und 32 Stunden - verliert das DPI 1 seinen Vorsprung an das DPI 2, das von nun an mit Abstand die höchste spezifische Aktivität aufweist.

IV. Diskussion der Ergebnisse des ^{32}P -Einbaus

Unter Verwendung radioaktiver Isotope konnten wir eindeutig feststellen, daß alle drei Inositphosphatide des Rattehirns einen sehr aktiven Phosphat-Stoffwechsel aufweisen, und daß bei den beiden Verbindungen der Diphosphoinositid (=DPI)-Fraktion der in vivo-Einbau von ^{32}P noch schneller vor sich geht als beim Monophosphoinositid (=MPI).

Unsere Ergebnisse stehen in direktem Gegensatz zu den Untersuchungen von HOKIN und HOKIN⁸⁵⁾, die betonen, daß die Einbaurate des DPI gegenüber dem MPI verschwindend gering ist. Diese Schlußfolgerung läßt sich damit erklären, daß die von den Autoren analysierte Meerschweinchen-Gehirnrinde vermutlich kein DPI enthielt⁸⁶⁾.

Auch in den Übersichtsberichten von HAWTHORNE⁸⁷⁾ und von

85) L.E.HOKIN u. M.R.HOKIN, J.biol.Chemistry 233, 818 (1958)

86) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. J.HÖLZL, Biochem.Z. 332, 269 (1960)

87) J.N.HAWTHORNE, J.Lipid Res. 1, 255 (1960)

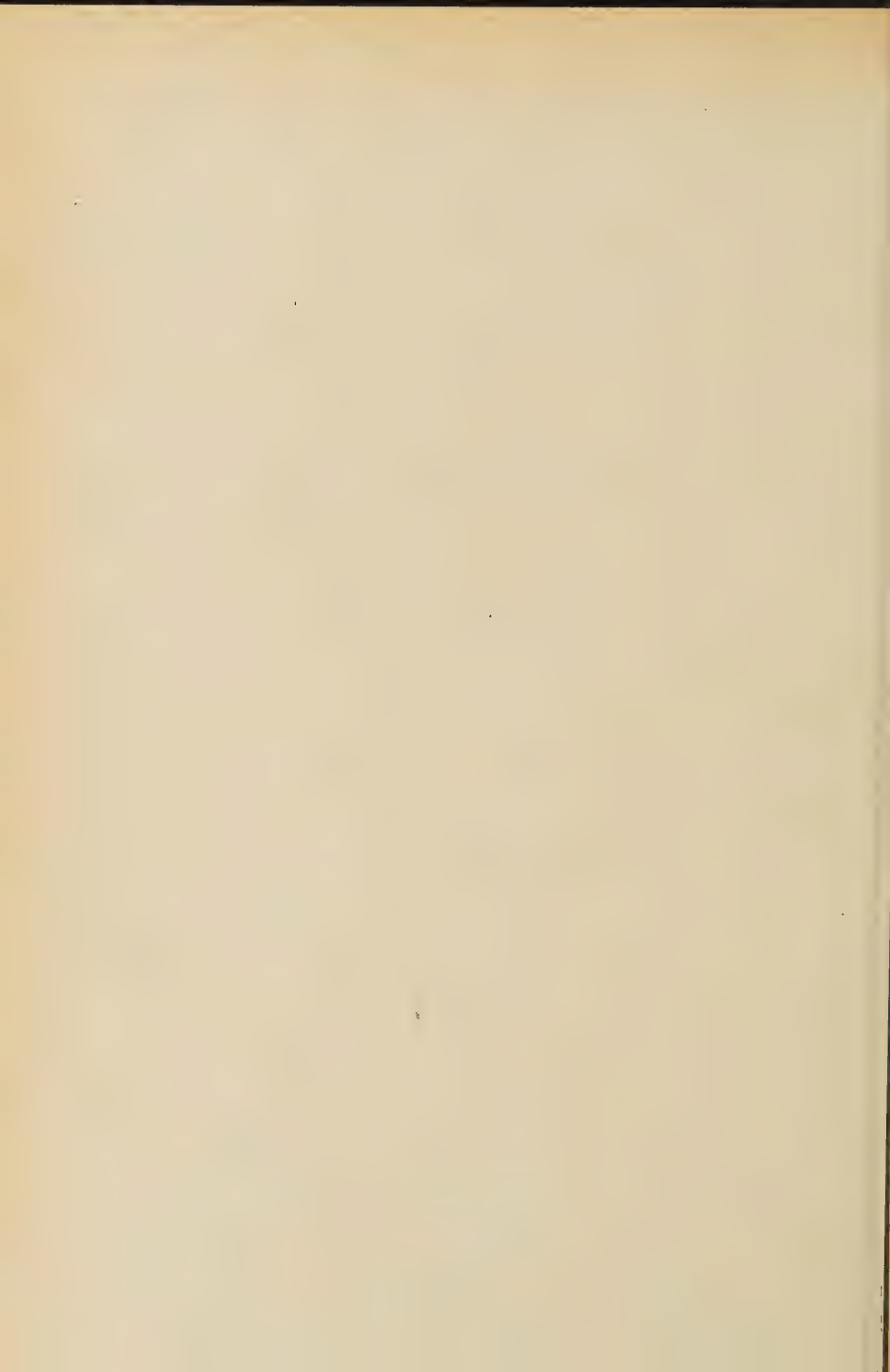
LE BARON⁸⁸⁾ wird auf Grund der Arbeit von HOKIN und HOKIN dem MPI eine hohe Stoffwechselaktivität zugesprochen im Gegensatz zum DPI.

Da die beiden Verbindungen der DPI-Fraktion in der ³²P-Einbaurate ungefähr gleich liegen ergibt sich auch hieraus wiederum, was bereits aus den analytischen Untersuchungen zu ersehen war, daß wir mit Sicherheit eine zusammengesetzte DPI-Fraktion vorliegen haben, deren einzelne Verbindungen aber nicht nur strukturell, sondern auch in ihrer physiologischen Funktion große Ähnlichkeit besitzen.

88) F.N. LeBARON, Annu. Rev. Biochem. 28, 579 (1959)



EXPERIMENTELLER THEIL



A. Gewinnung der Inositphosphatide

1. Extraktion und Fraktionierung der Phosphatide nach FOLCH⁸⁹⁾

1.8 g frisches Rattenhirn wurde unter Zugabe von 7 ml Aceton in einer Porzellanreibschale zerkleinert, das Aceton abfiltriert, das Gewebe nochmals mit 7 ml Aceton, und anschließend mit 4 ml Alkohol ausgezogen.

Nach dieser Vorextraktion erfolgte zweimalige Extraktion mit je 8 ml Petroläther 30 - 60°. Der Petroläther-Hauptextrakt enthielt 40 mg Rohkephalin.

- a) Zur Reinigung des Rohkephalins wurde die Petrolätherlösung auf 4 ml im Vakuum eingengt und durch tropfenweisen Alkoholzusatz eine Cerebrosid- und Kephalinfraktion ausgefällt, die auch Lecithin enthielt. Der in 2 ml Äther gelöste Anteil des Niederschlags wurde zur nochmaligen Ausfällung des Kephalins mit 2 ml absolutem Alkohol versetzt. Lecithin bleibt in Lösung und wird mit dem Überstand entfernt.

Das Präzipitat wog nach den zwei Umfällungen nur noch einige Milligramm und war immer noch mit Lecithin verunreinigt, während sich in den Überständen Kephalin fand und dadurch verloren ging. Dieser Weg kam daher zur Gewinnung der Inositphosphatide nicht in Frage.

- b) Um eine bessere Ausbeute zu erhalten, versuchten wir 35 mg Rohkephalin ohne Vorreinigung über die FOLCH-Fraktionierung aufzutrennen. Hierzu wurde das Rohkephalin mit der 12fachen Menge Chloroform versetzt, um die Inositphosphatide, das Phosphatidylserin und -äthanolamin zu lösen. Wir zentrifugierten vom Ungelösten ab und versetzten den Überstand mit 0.5 ml absolutem Alkohol zur Gewinnung der FOLCH I -Fraktion. Der weiße, voluminöse Niederschlag enthielt nur wenig Phosphatide, Inositphosphatide nur in Spuren. Die Alkoholkonzentration der

89) J.FOLCH, J.biol.Chemistry 146, 35 (1942)

Phosphatidlösung wurde auf 59 % gebracht durch weitere Zugabe von 0.1 ml absol. Alkohol und die FOLCH II-Fraktion abzentrifugiert und nach weiterem Zusatz von 1.2 ml absol. Alkohol zum Überstand der FOLCH II-Fraktion die FOLCH III-Fraktion ausgefällt.

Die Hauptmenge der Inositphosphatide wurde in Fraktion II neben Phosphatidylserin und -äthanolamin wiedergefunden, Fraktion III hatte qualitativ die gleiche Zusammensetzung, mengenmäßig herrschte hier Phosphatidylserin vor.

Eine Fraktionierung durch Chloroform-Äthanol-Fällungen nach FOLCH ist somit bei Rohkephalin nicht durchführbar, weil die erhaltenen Ausfällungen anders zusammengesetzt sind und keine Inositphosphatid-Anreicherung und -Reinigung erbringen.

90)91)

2. Extraktion und Reinigung der Inositphosphatide nach HAWTHORNE

Ein Rattenhirn von 1.9 g Frischgewicht wurde unter Zugabe von 6 ml Chloroform-Methanol 2:1 in einer Porzellanreibschale zerkleinert. Bei späteren Versuchen stand ein Homogenisator zur Verfügung. Nach einer Stunde wurde die Chloroform-Methanol-Lösung abfiltriert und das Gewebe nochmals mit 6 ml der gleichen Mischung extrahiert. Von den vereinigten Chloroform-Methanol-Auszügen wurde die sich bildende wässrige Methanol-Oberphase verworfen, die Chloroformphase mit Natriumsulfat sicc. getrocknet und im Vakuum auf 1 ml eingeengt.

Durch Zugabe von 5 ml Aceton zum Chloroformextrakt wurden die Phosphatide ausgefällt und die Fällung über Nacht bei 4° C stehen gelassen. Das abzentrifugierte Präzipitat wurde in 1 ml Chloroform gelöst und der Phosphatidanteil nochmals durch Zusatz von 3 ml Aceton ausgefällt. Im Überstand befanden sich Neutralfette, Cholesterin und Fettsäuren, die bei der ersten Fällung im Niederschlag eingeschlossen worden waren.

90) J.N.HAWTHORNE, Biochem.J. 59, 2p. (1955)

91) J.N.HAWTHORNE, Biochem.J. 75, 495 (1960)

Zur Kephalin-Fällung wurden 1 ml Phosphatid-Chloroform-Lösung mit 2 ml absolutem Alkohol versetzt, der Niederschlag in Äther gelöst und über Nacht bei 4° C stehen gelassen, der ätherlösliche Kephalinanteil wurde nochmals mit 3 ml Alkohol absol. versetzt und das jetzt nur noch spärlich anfallende Präzipitat in Chloroform-Methanol 1:1 gelöst. Da der Substanzverlust bei den Umfällungen solch geringer Ausgangsmengen zu groß ist, wurde der Isolierungsgang nach HAWTHORNE abgebrochen.

3. Extraktion der Lipide nach DAWSON 1953⁹²⁾

2 g frisches Rattenhirn wurden mit 25 ml 10%iger Trichloressigsäure 3 Minuten homogenisiert. Der dünnflüssige Brei wurde dann in eine Soxhlethülse von 2 cm Durchmesser und 10 cm Länge gegossen und das Gewebe, nachdem die Trichloressigsäure, abgelaufen war, zunächst mit 60 ml 10%iger Trichloressigsäure, dann mit 100 ml Wasser nachgewaschen. Das letzte Waschwasser hatte einen pH von 3. Nachdem das Gehirnhomogenisat in der Soxhlethülse unter einer Infrarotlampe getrocknet worden war, wurde es fünf Stunden im Soxhlet mit Chloroform-Methanol 1:1 extrahiert. Die 105 ml Lipoidgesamtauszug wurden nach dem Erkalten mit 21 ml nHCl 5 Min. geschüttelt. Da sich die Phasen nicht trennten, setzten wir nochmals 80 ml nHCl zu und schüttelten nochmals 3 Min. Wir erhielten 37.5 ml Unterphase, trockneten diesen Chloroform-Lipoidextrakt mit Natriumsulfat sicc. und engten ihn im Vakuum auf 2 ml ein.

Zur Extraktgehaltsbestimmung wurden 2 mal je 0.2 ml Extrakt auf tarierte Aluminiumschälchen mit einem Gewicht von 0.8 bis 1.2 g pipettiert, unter der Infrarotlampe getrocknet, 1/2 Stunde im Exsiccator abgekühlt und gewogen.

Extraktgehalt: 155.1 mg

Nach der gleichen Vorschrift wurde ein Chloroform-Lipoidextrakt aus 1 g frischer Rattenleber hergestellt.

Extraktgehalt: 33.8 mg

4. Extraktion der Lipoide nach FOLCH und Mitarbeitern⁹³⁾

2 g frisches Rattenhirn wurden mit 40 ml Chloroform-Methanol 2:1 3 Min. homogenisiert und der entstandene dünnflüssige Brei durch ein fettfreies Faltenfilter in einen Scheidetrichter, der 8 ml Wasser enthielt, filtriert. Die Phasen wurden vorsichtig gemischt und nach erfolgter Abtrennung die Chloroformphase (27 ml) mit Natriumsulfat sicc. getrocknet und im Vakuum auf 2 ml eingengt.

Extraktgehalt: 146.7 mg.

Nach der gleichen Vorschrift wurde ein Chloroform-Lipoidextrakt aus 1 g frischer Rattenleber hergestellt.

Extraktgehalt: 29.9 mg.

Eigene Untersuchungen zur Extraktbereitung

5. Selektive Extraktion der Inositphosphatide

Für die eigenen Untersuchungen verwendeten wir frisches Kälberhirn aus dem Schlachthof. Nach grober Zerkleinerung im Multimix entwässerten wir das Gehirn durch Gefriertrocknung und setzten bei den Extraktionsversuchen jeweils etwa 1 g Trockensubstanz ein.

Das Kälberhirn wurde homogenisiert, in eine Extraktionshülse gegeben und 2 Stunden im Soxhlet extrahiert. Als Lösungsmittel verwendeten wir Äther, Petroläther, 60%igen Äthanol, 80%igen Äthanol, Benzol, Essigester, Pyridin, Tetrachlorkohlenstoff, sowie verschiedene Chloroform-Methanol-Mischungen.

6. Versuche zur Anreicherung der Inositphosphatide

- a) Durch Variation der Vorschriften von FOLCH und von HAWTHORNE versuchten wir eine Anreicherung der Inositphosphatide durch Fällung zu erreichen. Wir führten Chloroform-Methanol und Chloroform-Äthanol-Fällungen durch, veränderten die Konzentration der Lösungsmittel und versuchten, das Gleichgewicht der gelösten Stoffe durch verschieden lange und tiefe Kühlung zu verschieben.

93) J.FOLCH, M.LEES u. G.H.SLOANE-STANLEY, J.biol.Chemistry 226, 497 (1957)

- b) Die multiplikative Verteilung verwendeten wir zur Auftrennung eines Lipoidextraktes und Gewinnung der Inositphosphatide. Das Verteilungsmittel, bestehend aus Ligroin (600 ml), Methanol (388 ml) und Wasser (12 ml) schüttelten wir 30 Min. zur Absättigung, trennten die Phasen und füllten je 10 ml Unterphase in die 30 Verteilungselemente ein, ließen die Oberphase bis Glas 6 laufen, lösten in Glas 3 100 mg Lipoidgemisch und verteilten über 30 Stufen, indem wir bei jedem Schritt 30 mal schüttelten. Je zwei Ober- und Unterphasen wurden zusammengefaßt, das Lösungsmittel bei 30° im Vakuumtrockenschrank über Nacht abdestilliert, der Rückstand in 1 ml Chloroform gelöst und auf seine qualitative Zusammensetzung untersucht.
- c) Die Abtrennung der Inositphosphatide von den anderen Phosphatiden versuchten wir durch Chromatographie an Kieselgel nach HANAHAN⁹⁴⁾ zu erreichen. 80 g Kieselgel MERCK wurden in eine Säule von 15 mm Durchmesser eingefüllt, 60 mg Lipoidgesamtextrakt in 0.5 ml Chloroform gelöst auf die Säule gegeben und mit 130 ml Chloroform-Methanol 11:1, anschließend mit 450 ml Chloroform-Methanol 5:2 eluiert. Vom Lösungsmittel tropfte pro Minute 1 ml ab. 5 ml-Fractionen wurden aufgefangen, im Vakuumtrockenschrank bei 30° eingeengt und papierchromatographisch untersucht.

7. Fraktionierte Extraktion der Lipide aus Kälberhirn

Für die Vorversuche verwendeten wir frisches Kälberhirn aus dem Schlachthof, das wir im Multimix grob zerkleinerten und anschließend gefriergetrockneten.

Vorextraktion: 14.15 g gefriergetrocknetes Kälberhirn wurden unter Acetonzusatz 3 Min. homogenisiert, das Homogenisat in eine Soxhlethülse gegossen, mit dieser in eine Säule gebracht und 5 mal mit 100 ml Aceton extrahiert. Der Erfolg der Acetonextraktion wurde durch Bestimmung des Extraktgehaltes der einzelnen Auszüge verfolgt und ist aus nachstehender Tabelle 9 zu ersehen.

T a b e l l e 9

Auszug		Extraktgehalt	
Nr.	ml	in g	in % ⁺
1	100	0.78	5.5
2	100	0.42	3.0
3	100	0.15	1.0
4	100	0.06	0.42
5	100	0.04	0.28
zusammen	500	1.45	10.2

+bezogen auf 14.15 g Ausgangssubstanz

Bei der qualitativen Prüfung des Acetonextraktes auf Phosphatide wurde Lecithin, aber keine Inositphosphatide gefunden.

Hauptextraktion: Das gefriergetrocknete und mit Aceton zur Entfernung von Cholesterin, Neutralfetten und freien Fettsäuren vorbehandelte Kälberhirn wurde zur Extraktion der Phosphatide mit verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen ausgezogen.

a) Kalte Extraktion mit Äther: Das nach der Vorextraktion unter der Infrarotlampe getrocknete Gewebe wurde im Soxhlet kalt 15 mal mit Äther extrahiert. Wir arbeiteten dazu nicht mit dem Rückflußkühler, sondern ließen das Lösungsmittel aus einem Schütteltrichter zutropfen. Die Überläufe sammelten wir zur Extraktgehaltsbestimmung in zwei mal 125 ml-Portionen.

Der Extraktgehalt des Ätherauszugs aus 11.25 g gefriergetrocknetem Kälberhirn geht aus Tabelle 10 hervor:

T a b e l l e 10

Auszug		Extraktgehalt	
Nr.	ml	in g	in %
1	125	1.53	13.6
2	125	0.181	1.6
zusammen	250	1.711	15.2

- b) Kalte Extraktion mit Chloroform-Methanol 2:1: Wie unter a) beschrieben, wurde das vorbehandelte Kälberhirn-Homogenisat 15 mal mit Chloroform-Methanol 2:1 extrahiert und der Überlauf in zwei 125 ml-Fractionen und einer 60 ml-Fraction gesammelt.

Extraktgehalt des Chloroform-Methanol (2:1)-Auszugs aus 12.85 g gefriergetrocknetem Kälberhirn siehe Tabelle 11.

T a b e l l e 11

Auszug		Extraktgehalt	
Nr.	ml	in g	in %
1	125	3.06	23.8
2	125	1.25	9.74
3	60	0.355	2.76
zusammen	310	4.665	36.3

- c) Kalte Petroläther(30-60°)-Extraktion: Das vorbereitete Kälberhirn wurde wie unter a) beschrieben 15 mal kalt mit Petroläther 30 - 60° extrahiert und die Überläufe in zwei 125 ml- und einer 20 ml-Portion gesammelt. Der Extraktgehalt des Petrolätherauszugs aus 11.2 g gefriergetrocknetem Kälberhirn ist in Tabelle 12 wiedergegeben.

T a b e l l e 12

Auszug		Extraktgehalt	
Nr.	ml	in g	in %
1	125	0.74	6.6
2	125	0.355	3.17
3	20	0.018	0.16
zusammen	270	1.113	9.93

- d) Ätherextraktion im Soxhlet: 14.15 g gefriergetrocknetes Kälberhirn wurden nach der beschriebenen Vorbehandlung 3 Stunden im Soxhletapparat mit Äther extrahiert.

Extraktgehalt: 2.04 g = 14.4 %.

Nachextraktion: Das zweifach extrahierte Gehirnhomogenisat wurde unter der Infrarotlampe getrocknet und dann eine Stunde mit Chloroform-Methanol 1:1 ausgekocht.

Das bei Versuch b) bereits bei der Hauptextraktion mit Chloroform-Methanol ausgezogene Gewebe wurde zur Nachextraktion mit 80%igem Äthanol ausgekocht.

In den erhaltenen Extrakten konnten papierchromatographisch keine Inositphosphatide nachgewiesen werden. Ihre Hauptmenge befindet sich somit in den Hauptextrakten.

Nachstehende Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die Ausbeute für je vier Vor-, Haupt- und Nachextraktionen aus getrocknetem Kälberhirn.

T a b e l l e 13

Bestimmung	Kälberhirn in g	Extraktgehalt					
		Vorextraktion		Hauptextraktion		Nachextraktion	
		in g	%	in g	%	in g	%
a	11.25	1.2	10.7	1.71	15.2	2.43	20.8
b	12.85	1.34	10.4	4.67	36.3	1.94	15.1
c	11.2	1.25	11.2	1.12	9.9	3.94	35.1
d	14.15	1.45	10.2	2.04	14.4	3.3	20.3

Die Vorextraktionen wurden in allen Fällen mit Aceton durchgeführt. Die Hauptextraktion erfolgte in der Kälte bei a) mit Äther, bei b) mit Chloroform-Methanol 2:1, bei c) mit Petroläther, bei d) mit warmem Äther im Soxhlet. Zur Nachextraktion wurde bei a, c und d Chloroform-Methanol 1:1, bei b 80%iger Äthanol verwendet.

8. Fraktionierte Extraktion der Lipide aus Rattenhirn.

Zur Herstellung Inositphosphatid-reicher Extrakte aus jeweils einem Rattenhirn wurde ebenfalls eine fraktionierte Extraktion durchgeführt.

Das Rattenhirn mit einem Frischgewicht von 1.8 - 2 g wurde sofort nach Entnahme in flüssiger Luft eingefroren, gefriergetrocknet, unter Zusatz von 20 ml Aceton 3 Min. homogenisiert, das Homogenisat in eine Soxhlethülse gegossen, mit dieser in eine Säule gebracht und zur Entfernung von Cholesterin, Neutralfetten und Fettsäuren mit 200 ml Aceton vorextrahiert.

Die Inositphosphatide befanden sich im Hauptextrakt, der durch dreistündige Ätherextraktion im Soxhlet hergestellt wurde.

Zur Nachextraktion wurde das Gehirnhomogenisat anschließend noch eine Stunde mit Chloroform-Methanol 1:1 ausgekocht.

Der Extraktgehalt der Vor-, Haupt- und Nachextraktionen von fünf Rattenhirnen ist aus nachfolgender Tabelle zu ersehen.

T a b e l l e 14

Rattenhirn		Extraktgehalt					
Nr.	Frischgewicht in g	Vorextraktion (Aceton)		Hauptextraktion (Äther)		Nachextraktion (Chlorof.-Meth.)	
		mg	%	mg	%	mg	%
1	1.9	48.72	2.57	35.7	1.88	91	4.8
2	1.8	48.42	2.69	34.65	1.93	73.75	4.1
3	2.0	53.1	2.66	53.25	2.66	102	5.1
4	1.9	51.76	2.72	36.1	1.9	97	5.1
5	1.8	46.03	2.56	43.45	2.42	60	3.3

Der prozentuale Extraktgehalt ist auf das Rattenhirn-Frischgewicht bezogen. Zur Umrechnung auf Trockengewicht muß der prozentuale Extraktgehalt mit vier multipliziert werden, da das Gehirn bei der Gefriertrocknung rund 75% seines Frischgewichts verliert.

9. Papierchromatographische Auftrennung der Inositphosphatide

Der nach Vorextraktion mit Aceton gewonnene Ätherextrakt aus getrocknetem Rattenhirn wurde, wie bei HÖLZL⁹⁵⁾ beschrieben, chromatographiert und die Inositphosphatidfraktion aufgetrennt:

Das Chromatogrammpapier Nr. 2043 b der Firma Schleicher und Schüll wurde nach der Methode von HÖRHAMMER und Mitarbeitern⁹⁶⁾ mit Formaldehyd imprägniert. Als Fließmittel verwendeten wir die Oberphase von Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5). Das Gemisch wurde zunächst zur gegenseitigen Absättigung der Phasen 20 Min. geschüttelt. Um die Trennkapazität des Papiers vollständig auszunützen, chromatographierten wir stets absteigend über eine Wegstrecke von 40 - 45 cm. Die Laufzeit betrug bei 20° etwa 15 - 16 Stunden.

Zur Durchführung der Chromatographie wurde 8 cm vom oberen Papierrand entfernt eine Startlinie markiert und in dieser Höhe jeweils etwa 2 mg Extrakt in ätherischer Lösung punktförmig mit einer Mikropipette aufgetragen. Der Abstand der Punkte untereinander betrug 4 cm. Dann wurde der Chromatogrammbogen zum Äquilibrieren in die mit der Unterphase des Fließmittelgemischs gesättigte Kammeratmosphäre gehängt und der eigentliche Chromatographiervorgang erst zwei Stunden später durch Zugabe des Fließmittels gestartet.

Zum Anfärben der aufgetrennten Phosphatide wurde das Chromatogramm zunächst bei Zimmertemperatur getrocknet und dann mit den verschiedenen Reagenzien behandelt.

95) J.HÖLZL, Dissertation München 1959

96) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.RICHTER, Biochem.Z. 331, 155 (1959)

- a) Besonders gute Resultate lieferte für unsere Zwecke die Anfärbung der Lipide mit einer 0.1%igen Nilblaulösung. Zur Ergänzung dieser Befunde wurde auch von anderen Nachweismethoden - wie im Folgenden aufgeführt - Gebrauch gemacht.
- b) Bei der Entwicklung mit Ninhydrin werden alle Aminosäuren, sowie Phosphatidylserin und Phosphatidyläthanolamin sichtbar.
- c) Eine 0.01%ige Rhodamin-B-Lösung färbt alle Lipide an und läßt die Lysoverbindungen der Phosphatide dadurch deutlich werden, daß der adsorbierte Farbstoff beim Trocknen zerstört wird und die Lysoformen somit als weiße Flecke auf rosa Grund erscheinen.
- d) Phosphathaltige Flecke wurden mit dem Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagens aufgefunden.

Reagenslösung: Ammoniummolybdat 4%	25 ml
nSalzsäure	10 ml
Perchlorsäure 72%	5 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

Das Chromatogramm wird nach dem Besprühen zur Hydrolyse der organischen Phosphorsäureester 7 Min. bei 85° in einen Trockenschrank gehängt und dann zur Reduktion des Phosphor-Molybdänsäure-Komplexes unter eine bakterientötende TUV-Lampe (Philips) gelegt, nach wenigen Minuten erscheinen phosphathaltige Substanzen als blaue Flecke auf weiß bis hellblauem Untergrund.

- e) ³²P-haltige Flecke wurden durch Anfertigung eines Autoradiogramms sichtbar gemacht, oder konnten durch Abtasten des Papierchromatogramms mit einem Geigerzähler lokalisiert werden.

In der folgenden Tabelle sind die im Ätherextrakt des Rattenhirns aufgefundenen Phosphatide und Spaltprodukte sowie andere Lipide aufgeführt. Bei den Phosphatiden fällt sowohl der Lipoidnachweis durch Nilblaufärbung als auch der Phosphatnachweis mit dem Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagens oder mit ³²P positiv aus:

T a b e l l e 15

R _F -Werte	Substanz	Nilblau- färbung	Phosphat- nachweis
0.90	Cholesterin und Neutralfette	++	-
0.72	Lecithin	++	++
0.68	Phosphatidyläthanolamin	++	++
0.55	Phosphatidylserin	++	++
0.47	Monophosphoinositid	++	++
0.41	Diphosphoinositid 1	+	+
0.36	Diphosphoinositid 2	+	+
0.30	Gangliosid	+	-
0.28	Gangliosid	+	-
0.17	Glyzerinphosphat	-	+
0.13	anorg. Phosphat	-	++
0.02	unidentifiziert	-	+
Start	unidentifiziert	+	+

+ = positive Reaktion

++ = stark positive Reaktion

- = negative Reaktion

B. Quantitative Bestimmungen

1. Phosphatbestimmungen

Neben dem Gehalt an Extraktivstoffen bestimmten wir bei den verschiedenen Gehirnextrakten auch ihren Gehalt an Gesamtphosphor und an anorganischem Phosphor und errechneten aus der Differenz den organisch gebundenen Phosphor.

- a) Anorganisches Phosphat bestimmten wir nach ERNSTER und Mitarbeitern⁹⁷⁾. Diese Vorschrift ist eine Modifikation der Methode von MARTIN und DOTY⁹⁸⁾, die sich von der Phosphatbestimmung nach BERENBLUM und CHAIN⁹⁹⁾ ableitet.

Lösungen A = 10n Schwefelsäure

B = 10%ige Ammoniummolybdatlösung

C = Isobutanol-Benzol-Mischung 1:1

D = 10%ige Zinnchlorürlösung in konzentrierter Salzsäure, frisch verdünnt mit nSchwefelsäure auf das 200fache.

E = 3.2%ige (V/V) Schwefelsäure in absolutem Alkohol

Durchführung: Die zu bestimmende Lösung, die zwischen 1.5 und 300 γ Phosphat enthalten kann, wird auf 3 ml verdünnt und nach Zugabe von 0.5 ml der Lösung A, 5 ml der Mischung C und 0.5 ml der Lösung B 15 Sekunden geschüttelt. Je nach erwarteter Phosphormenge wird von der Oberphase 0.1 bis 2.5 ml abgenommen, mit E auf 5 ml verdünnt, 0.5 ml von D zugesetzt und gut umgeschüttelt. Die auftretende Blaufärbung wird im ZEISS-Spektralphotometer bei 730 m μ gemessen.

Zur Umrechnung der Extinktion in γ Phosphor benützten wir einen im Parallelversuch ermittelten Standardwert. Meistens wurden 5 γ P als Standard bestimmt. Ihre Extinktion (=Extinktion_{5 γ}) in Beziehung gesetzt zur Extinktion der Untersuchungsprobe (=Extinktion_x) ergibt:

97) L.ERNSTER, R.ZETTERSTRÖM u. O.LINDBERG, Acta chem.Scand. 4, 942 (1950)

98) J.B.MARTIN u. D.M.DOTY, Analytic. Chem. 21, 965 (1949)

99) I.BERENBLUM u. E.CHAIN, Biochem.J. 32, 295 (1938)

$$\gamma P = \frac{\text{Extinktion}_x \cdot 5}{\text{Extinktion}_{5\gamma}}$$

Diese Berechnungsart gibt beste Ergebnisse, da kleine Schwankungen der Versuchsbedingungen (Meßgerät, Temperatur, Reduktionsmittel) kompensiert werden und durch den Standardwert gleichzeitig die Methode kontrolliert wird.

Standardlösung: 40 mg über Schwefelsäure getrocknetes primäres Kaliumphosphat werden in 1000 ml Wasser gelöst.
1 ml = 10 γ P.

- b) Gesamtposphat wurde mit der gleichen Methode nach Veraschung der organischen Substanz bestimmt.

Veraschung organischer Substanz nach LOWRY und Mitarbeitern¹⁰⁰⁾: Die zu veraschende Substanz wird mit 0.4 ml Veraschungssäure (65 ml 72%ige Perchlorsäure und 500 ml 20n Schwefelsäure werden mit Wasser zu 1 l verdünnt.) 2 Stunden auf 100° C erhitzt, anschließend 2 Stunden auf 185° C. Die entstandene Lösung muß farblos und klar sein. Sie wird vor der Phosphatbestimmung unter Zugabe von 3 ml Wasser 5 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt, damit sich das bei der Veraschung bildende Metaphosphat wieder in Orthophosphat umwandelt.
Bei der Phosphatbestimmung nach Veraschung entfällt eine weitere Säurezugabe.

- c) Organisch gebundenes Phosphat ergibt sich aus der Differenz von Gesamtposphat minus anorganischem Phosphat.

Tabelle 16 gibt eine Übersicht über den Phosphorgehalt in vier Kälberhirn-Extrakten, die nach Gefriertrocknung und Vorextraktion mit Aceton durch Verwendung verschiedener Extraktionsmittel hergestellt wurden. Ausgangsmaterial: jeweils 50 g frisches Kälberhirn.

100) O.H.LOWRY, N.R.ROBERTS, K.Y.LEINER, MEI-LING WU u. A.L.FARR, J.biol.Chemistry 207, 1 (1954)

T a b e l l e 16

Extraktionsmittel	Gesamt-P in mg	anorg.P in mg	organisch-geb. P in mg
Äther, kalt	42.2	1.3	40.9
Chloroform-Methanol, kalt	89.8	6.2	83.6
Petroläther, kalt	31.9	2.9	29.0
Äther, warm	59.3	5.2	54.1

Zu den in Tabelle 16 enthaltenen Werten ist ein Auszug aus dem Arbeitsprotokoll in der nachfolgenden Tabelle 17 wiedergegeben.

T a b e l l e 17

Extraktions- mittel und Extraktgehalt in g	P-Bestimmung			P-Gehalt des Kälberhirnextr.	
	Nr.	eingesetzter Extrakt mg	P gefunden in γ	mg	%
Gesamtphosphat					
Äther, kalt 1.71	1	2.04	53.0	44.5	2.5
	2	2.04	52.5	44	
	3	2.04	46.0	38.6	
	MW			42.2	
Chloroform- Methanol 2:1 kalt 4.67	1	1.96	44.3	105.0	1.9
	2	1.96	36.5	86.8	
	3	1.96	32.7	77.8	
	MW			89.8	
Petroläther, kalt 1.12	1	1.95	56.9	32.7	2.85
	2	1.95	57.7	33.1	
	3	1.95	50.4	29.9	
	MW			31.9	
Äther, warm 2.04	1	2.57	83.5	66.5	2.91
	2	2.57	70.9	56.2	
	3	2.57	69.7	55.2	
	MW			59.3	
anorganischer Phosphor					
Äther, kalt 1.71	1	2.04	1.86	1.56	0.08
	2	2.04	1.3	1.1	
	MW			1.33	
Chloroform- Methanol 2:1 kalt 4.67	1	1.96	2.5	6.0	0.13
	2	1.96	2.7	6.4	
	MW			6.2	
Petroläther, kalt 1.12	1	1.95	4.7	2.7	0.26
	2	1.95	5.4	3.1	
	MW			2.9	
Äther, warm 2.04	1	5.0	12.4	5.07	0.26
	2	5.0	13.2	5.39	
	MW			5.23	

MW = Mittelwert

2. Phosphatidbestimmungen

- a) Veraschung der Phosphatidflecke. Da wir bei der Veraschung der aus dem Chromatogramm eluierten Phosphatide nur zwischen 80 und 90% der eingesetzten Substanz wiederfanden, veraschten wir die Phosphatide zusammen mit dem Chromatogrammpapier.

Die Veraschung des Chromatogrammpapiers mußte dabei mit möglichst wenig Säure erfolgen, da die Lösung zur nachfolgenden Phosphatbestimmung auf 1 Normalität eingestellt werden muß und das Reaktionsvolumen möglichst bei 3 ml liegen soll.

- α) Modellversuche: 9 cm² Chromatogrammpapier wurden zur nassen Veraschung mit 0.5 ml 20n Nitriersäure (25 ml Schwefelsäure von D = 1.84 und 75 ml Salpetersäure von D=1.4) versetzt und erhitzt. Es bildete sich ein verkohlter Rückstand, der sich auch nach Zusatz von 30%igem Wasserstoffsuperoxyd nicht aufhellte.

Weitere 9 cm² Chromatogrammpapier wurden mit 0.5 ml Veraschungssäure nach LOWRY und Mitarbeitern¹⁰¹⁾ (0.8n Perchlorsäure in 10n Schwefelsäure) behandelt. Auch nach Zugabe von 30%igem Wasserstoffsuperoxyd veränderte sich die gebildete Papierkohle nicht mehr.

Bei Verwendung von 0.5 ml 72%iger Perchlorsäure (11.8n) zur nassen Veraschung von 9 cm² Chromatogrammpapier löste sich das Papier rasch auf, die Farbe der Lösung war hellgelb. Beim Erhitzen auf 110° C färbte sich die Lösung dunkel, wurde nach Zugabe von 5 Tropfen 64%iger Salpetersäure unter heftiger Gasentwicklung hellbraun und nach weiteren 5 Tropfen hellgelb bis weiß.

Ohne Salpetersäurezusatz gelang die Veraschung des Chromatogrammpapiers mit 72%iger Perchlorsäure, wenn diese mit Ammoniummolybdat als Katalysator gesättigt war. Bei 50°C löste sich das Chromatogrammpapier unter Schwarzfärbung, bei 70° C setzte in der Lösung für einige Sekunden eine heftige Gasentwicklung ein, bei 150° C wurde die Lösung hellbraun und nach einiger Zeit hellgelb bis weiß.

101) O.H.LOWRY, N.R.ROBERTS, K.Y.LEINER, MEI-LING WU u. A.L.FARR, J.biol.Chemistry 207, 1 (1954)

β) Durchführung: Die nasse Veraschung der Chromatogrammflecke mit Perchlorsäure nahmen wir unter genormten Bedingungen vor, so daß wir die Säurekonzentration der nach der Veraschung verbleibenden Phosphatlösung auf einer Kurve ablesen konnten.

Zur Veraschung setzten wir JENAer FIOLAX-Reagensgläser, die Veraschungsgut und -säure enthielten in 2.5 cm tiefe und dem Durchmesser der verwendeten Reagensgläser genau entsprechende schräge Bohrungen eines mit Thermometer versehenen Aluminiumblocks, der auf einer Heizplatte stand. Bei Schalterstellung 1 erreichte der Aluminiumblock nach 2 Stunden eine Temperatur von 180° C, die der Block beibehielt. Nach weiteren 2 Stunden wurde abgeschaltet.

Auf diese Art veraschten wir Chromatogrammpapierflecke verschiedener Größe und titrierten die zurückbleibende Säure. Der Verbrauch an 72%iger Perchlorsäure zur Veraschung von 0 - 8 cm² Chromatographierpapier Nr. 2043 b der Fa. Schleicher und Schüll ist aus Tabelle 18 zu ersehen. Die entsprechende Kurve befindet sich im allgemeinen Teil auf Seite 28

T a b e l l e 18

Papier cm ²	Veraschungssäure: 72%ige Perchlorsäure		
	ml zur Veraschung eingesetzt	nach Veraschung zurücktitriert nNaOH ml	ml zur Veraschung verbraucht
0	0.5	5.7	0
2	0.5	5.1	0.05
4	0.5	4.51	0.10
6	0.5	3.88	0.15
8	0.5	3.24	0.20
10	0.5	nicht verascht	

b) Phosphatbestimmung nach LOWRY. Nach Vergleich einiger Phosphatbestimmungsmethoden wählten wir die empfindlichsten aus und untersuchten diese in Zusammenhang mit der oben beschriebenen Perchlorsäure-Veraschung. Wir erhielten die besten Er-

gebnisse mit der Ascorbinsäure-Reduktion bei 38°, die erstmals von AMMON und HINSBERG¹⁰²⁾ vorgeschlagen und von LOWRY und Mitarbeitern¹⁰³⁾ zu einer Mikromethode verbessert wurde.

- α) Reduktionsbedingungen. Zur Reduktion der Phosphormolybdänsäure muß eine bestimmte Säurekonzentration eingehalten werden, da bei zu niedrigem pH auch in Abwesenheit von Phosphat Molybdänblau entsteht und bei zu hoher Säurekonzentration die Farbentwicklung ganz unterbleibt.

Wir untersuchten, in welchem pH-Bereich die maximale Empfindlichkeit der Methode konstant bleibt und führten dazu die Reduktion der Phosphormolybdänsäure in 0.2 - 2 normalen Perchlorsäurelösungen durch. Alle anderen Versuchsbedingungen blieben unverändert: Ammoniummolybdatkonzentration 0.25%, Ascorbinsäurekonzentration 1%, Phosphorkonzentration 2 γ in 4 ml, vorliegend als Phosphat, Reduktionszeit 2 Stunden bei 38°. (Tabelle 19).

T a b e l l e 19

Phosphatbestimmung nach LOWRY bei Säurekonzentrationen von 0.2 bis 2n.

Normalität der Reaktionslösung	E ₈₂₀ (d=1cm)	
	Blindprobe	2 γ P in 4 ml
0.2	2.0	2.0
0.4	0.175	0.47
0.6	0.01	0.375
0.8	0.01	0.375
1.0	0.01	0.375
1.2	0.01	0.375
1.4	0.01	0.375
1.6	0.01	0.37
1.8	0.01	0.335
2.0	0.01	0.23

} Konstanzbereich
E=23300

- β) Durchführung: Das Gewicht der zu veraschenden Inositphosphatidflecke lag zwischen 20 und 70 mg pro Fleck. - Bei der Veraschung von Phosphatidflecken erwies es sich als

- 2) R.AMMON u. K.HINSBERG, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 239, 207 (1936)
3) O.H.LOWRY, N.R.ROBERTS, K.Y.LEINER, MEI-LING WU u. A.L.FARR, J.biol.Chemistry 207, 1 (1954)

zweckmäßig die Flecke nicht nach Fläche, sondern nach Gewicht zu behandeln. 2 cm² Papier wiegen 26 mg. - Wir veraschten wie beschrieben unter Einsatz von je 0.4 ml 72%iger, mit Ammoniummolybdat als Katalysator gesättigter, Perchlorsäure, Nach beendeter Veraschung gaben wir 2 ml Wasser zu der abgekühlten Phosphatlösung und stellten das Reagensglas 5 Minuten in ein kochendes Wasserbad, um bei der Veraschung gebildetes Metaphosphat wieder in Orthophosphat umzuwandeln.

Die Lösung wird nach dem Abkühlen mit 0.3 ml 2.5%iger Ammoniummolybdatlösung und mit 0.3 ml 10%iger Ascorbinsäurelösung versetzt und zwei Stunden bei 38° C inkubiert.

Die auftretende Blaufärbung wird im ZEISS-Spektralphotometer bei 820 mμ gemessen.

Nach dieser Vorschrift lassen sich Chromatogrammflecke bis zu 90 mg verarbeiten, Flecke im Gewicht von 90 - 190 mg veraschten wir mit der doppelten Menge Perchlorsäure, also 0.8 ml, und verdoppelten auch alle weiteren Mengenangaben.

c) Berechnung der Phosphatide. (Siehe hierzu Tabelle 20)

Als erstes wurde die Extinktion des veraschten Chromatogrammpapiers mit Hilfe eines parallel bestimmten Papierstandards bestimmt (1).

$$(1) \quad \text{Extinktion}_{\text{Chr-Pa}} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Pa-St}} \times \text{mg Chr-Fl}}{\text{mg Pa-St}}$$

Chr-Fl = Chromatogramm-Fleck
Chr-Pa = Chromatogramm-Papier
Pa-St = Papier-Standard

Der Phosphatidanteil am Gewicht des Chromatogrammflecks beträgt rund 0.1% und wurde in Gleichung (1) vernachlässigt.

Die errechnete Extinktion des veraschten Chromatogrammpapiers wurde dann von der gemessenen Extinktion des veraschten Chromatogrammflecks abgezogen (2). Die Differenz ist die dem Phosphoranteil des Chromatogrammflecks entsprechende Extinktion.

$$(2) \quad \text{Extinktion}_{\text{P-Chr-Fl}} = \text{Extinktion}_{(\text{Chr-Fl})} - (\text{Chr-Pa})$$

In Tabelle 20: Spalte 3 - 4 = Spalte 5

Aus der Extinktion des P-Anteils und der Extinktion eines parallel ermittelten $1\gamma\text{P}$ -Eichwertes ergibt sich der Phosphorwert der mit dem Chromatogrammpapier veraschten Substanz (3):

$$(3) \quad \gamma^{\text{P}}_{\text{Phosphatid}} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{P-Chr-Fl}}}{\text{Extinktion}_{1\gamma}}$$

Mit Hilfe der in Tabelle 4, Seite 31, aufgeführten Umrechnungsfaktoren werden aus den P-Werten die in den einzelnen Chromatogrammflecken enthaltenen Phosphatidmengen berechnet (4):

$$(4) \quad \gamma_{\text{Phosphatid}} = \gamma_{\text{Phosphor}} \times \text{Faktor}$$

T a b e l l e 20

Chromatogrammfleck		E ₈₂₀ mμ			P in γ	Phospha- tid in γ
Substanz	Gewicht mg	gemessen	Papier-BW errechnet	P-Anteil errechnet		
1	2	3	4	5 = 3-4	6	7
Standard 1	28.6	0.26	0.02	0.24	1	
Standard 2	56.9	0.526	0.04	0.486	2	
Papier-Std.	35.7	0.025			0	
1) Ätherextrakt 35.7 mg; davon aufgetrennt 2.15 mg						
MPI	65.6	0.72	0.046	0.674	2.78	77.2
DPI 1	31.8	0.22	0.022	0.198	0.82	11.2
DPI 2	26.8	0.16	0.019	0.141	0.58	7.9
2) Ätherextrakt 34.7 mg; davon aufgetrennt 2.1 mg						
MPI	70.3	0.60	0.049	0.551	2.27	63.1
DPI 1	39.7	0.147	0.028	0.119	0.49	6.7
DPI 2	42.6	0.27	0.03	0.24	0.99	13.6
3) Ätherextrakt 53.3 mg; davon aufgetrennt 2.12 mg						
MPI	50.0	0.48	0.035	0.445	1.84	51.2
DPI 1	32.5	0.17	0.023	0.147	0.61	8.4
DPI 2	30.4	0.14	0.021	0.119	0.49	6.7
4) Ätherextrakt 36.1 mg; davon aufgetrennt 2.15 mg						
MPI	52.7	0.54	0.037	0.503	2.08	57.8
DPI 1	40.9	0.208	0.029	0.179	0.74	10.2
DPI 2	35.5	0.175	0.025	0.15	0.62	8.5
5) Ätherextrakt 43.5 mg; davon aufgetrennt 2.32 mg						
MPI	49.9	0.68	0.035	0.645	2.66	74.0
DPI 1	48.2	0.276	0.034	0.242	1.0	13.7
DPI 2	30.8	0.245	0.022	0.223	0.92	12.6

MPI = Monophosphoinositid

DPI = Diphosphoinositid

BW = Blindwert

C. Einbau und Messung von ^{32}P

1. Markierung der Phosphatide mit ^{32}P in vivo

Das radioaktive Isotop ^{32}P bezogen wir trägerfrei als Na_2HPO_4 in physiologischer Kochsalzlösung über die Farbfabriken BAYER AG, Leverkusen. Die Konzentration der sterilen, isotonischen Lösung betrug zur Zeit ihrer Ankunft bei uns 5 mC/ml. Die spezifische Aktivität des Phosphors betrug zur gleichen Zeit 1 mC/ γP .

Ausgewachsene männliche Albinoratten im Gewicht von 250 bis 290 g erhielten 0.2 ml der ^{32}P -Lösung subcutan in die Innenseite der hinteren Extremitäten gespritzt.

Der ^{32}P -Einbau wurde nach verschiedenen Zeitintervallen durch Töten der Tiere beendet. Die Organe wurden sofort entnommen, eingefroren, und vor der Weiterverarbeitung gefriergetrocknet. Nach Extraktion und papierchromatographischer Auftrennung untersuchten wir die mit ^{32}P markierten Inositolphosphatide.

2. Messung von ^{32}P

Zur Messung markierter Substanzen stand ein digitaler Strahlungsmeßplatz MS Str. 610/1 mit einem Methan Durchflußzähler MS MD 632/1 und einem Geiger-Müller-Fensterzählrohrkopf Typ MS GM 592/1 der Fa. TELEFUNKEN zur Verfügung. Chromatogramme mit markierten Substanzen werteten wir außerdem durch Autoradiographie aus, wobei wir die der Radioaktivität proportionale Schwärzung der Autoradiogramme mit dem ELPHOR-INTEGRAPH der Fa. Bender und Hobein in Extinktionskurven übertrugen.

- a) Messung der den Ratten eingespritzten ^{32}P -Lösung: Von der Na_2HPO_4 -Lösung, die 5 mC ^{32}P im ml enthielt, wurden 0.1 ml auf 100 verdünnt und von dieser Verdünnung je 0.1 ml auf Aluminiumschälchen von 5 cm Durchmesser für den Methan-Durchflußzähler, oder von 2.5 cm Durchmesser für das Geiger-Müller-Zählrohr getropft und unter der Infrarotlampe getrocknet.

Zur Messung im Durchflußzähler wurden die Schälchen dann in den Meßraum eingebracht, dieser nach dem Verschließen eine Minute mit Methan durchgespült und die Probe dreimal eine Minute gemessen.

Bei Verwendung des Geigerzählers wurde das Präparateschälchen in 1 cm Abstand vom Zählrohrfenster aufgestellt und bei allen Messungen auf genaueste Einhaltung der Geometrie geachtet. Meßdauer: dreimal eine Minute.

Blindwert: Zu Beginn jeder Meßreihe wurde bei 10-minütiger Meßzeit der Blindwert der Versuchsanordnung festgestellt. Er betrug durchschnittlich 20 Impulse/Minute.

Tabelle 21 enthält die mit Methan-Durchflußzähler und mit Geiger-Müller-Fensterzählrohrkopf gemessenen Impulse der $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ -Lösung nach Ankunft bei uns am 23.6.60 - 17⁰⁰.

T a b e l l e 21

Probe	Messung	Zählrohr	
		Geiger-Müller Imp./Min.	Methan-Durchfluß Imp./Min.
1	1	74224	
	2	74280	
	3	73847	
2	1	72599	
	2	72696	
	3	72463	
3	1	68864	
	2	69169	
	3	<u>69214</u>	
		647356 : 9 = 71928	
		<u>-BW</u>	20
			71908
4	1		761508
	2		763080
	3		<u>762110</u>
			2286698 : 3 = 762232
			<u>-BW</u>
			24
			762208

BW = Blindwert

In 0.2 ml der Na_2HPO_4 -Lösung, die nach Angabe der Lieferfirma bei Ankunft in München am 23.6.60 1 mC enthielt, wurden mit dem Methan-Durchflußzähler $1.524 \cdot 10^9$ Imp./Min. gemessen, das sind $2.54 \cdot 10^7$ Imp./Sek. ($1 \text{ mC} = 3.7 \cdot 10^7$ Imp./Sek.)

Gleichzeitig wurde der Umrechnungsfaktor von Geiger-Müller-Zählrohr zu Methan-Durchflußzähler ermittelt. Er betrug 10.6.

Bei allen folgenden Messungen wurde die Anzahl Impulse pro Minute auf die Anfangsaktivität umgerechnet. Der hierzu erforderliche Faktor wurde mit einer Eichprobe festgestellt.

b) Messung der Rattenhirnextrakte. (Tabelle 22)

Zählrohr: Geiger-Müller-Fensterzählrohr

Meßdatum: 27.6.60; Eichprobe: 58941 Imp./Min.

Umrechnungsfaktor: 71908 : 58941 = 1.22

T a b e l l e 22

³² P-Einbau in Std.	Nr. Meßprobe Gewicht in mg	Relative Aktivität			Spez. Aktivität
		Imp./Min.	-BW	x Faktor	Imp./Min./mg Subst.
Rattenhirn-Homogenisat		18			1.22
2	0.88	95	77	94	107
4	1.59	294	276	336.7	212
8	1.66	246	228	278.2	168
16	1.13	252	234	275.5	217
32	1.9	520	502	612.4	323
Rattenhirn-Acetonextrakt (Vorextraktion)					
2	8.12	37	19	32	4
4	8.07	85	67	112	14
8	8.85	103	85	143	16
16	8.96	312	294	495	55
32	15.5	853	835	1410	91
Rattenhirn-Ätherextrakt (Hauptextraktion)					
2	1 3.39	438	420	512.4	152
	2 3.75	528	510	622.2	166
4	1 3.79	856	838	1022.4	270
	2 3.14	752	734	895.5	286
8	1 5.79	1093	1075	1311.5	227
	2 4.86	1047	1029	1255.4	259
16	1 3.34	773	755	921.1	276
	2 3.88	894	876	1068.7	275
32	1 11.55	5677	5659	6904.0	598
	2 11.60	5138	5120	6246.4	538
Rattenhirn-Chloroform-Methanolextrakt (Nachextraktion)					
2	3.64	109	91	110	30
4	2.95	198	180	219.6	75
8	4.08	188	170	207.4	51
16	3.88	272	254	309.9	80
32	4.8	640	622	736.8	154

BW = Blindwert

c) Messung der Rattenleber-Extrakte (Tabelle 23)

Zählrohr: Geiger-Müller-Fensterzählrohr

Meßdatum: 27.6.60; Eichprobe: 58941 Imp./Min.

Umrechnungsfaktor: 71908 : 58941 = 1.22

T a b e l l e 23

Meßprobe		Relative Aktivität			Spez. Aktivität
		Imp./Min.	-BW	x Faktor	Imp./Min./mg Substanz
Material	Gewicht in mg		18	1.22	
Leber-homogenisat	7.69	24389	24371	29733	3870
Ätherextrakt	4.89	40104	40086	48905	10000
Gesamtextr. n.DAWSON	3.39	10847	10829	13211	3897
Gesamtextr. n.FOLCH	2.38	9806	9788	11941	4150

d) Messung der Phosphatide des Rattenhirn-Ätherextraktes
(Tabelle 24)

Zur Bestimmung von ^{32}P in papierchromatographisch getrennten Phosphatiden wurden die Chromatogrammeflecke ausgeschnitten, in ein Aluminiumschälchen von 5 cm Durchmesser gelegt und dreimal eine Minute gemessen.

Zählrohr: Methan-Durchflußzähler

Meßdatum: Nr. 1 - 10 : 1.7.60; Eichprobe: 467612 Imp./Min.

Umrechnungsfaktor: 762208 : 467612 = 1.63

Nr. 11 - 25: 30.6.60; Eichprobe: 476380 Imp./Min.

Umrechnungsfaktor: 762208 : 476380 = 1.6

T a b e l l e 24

Substanz	³² P-Einbau in Std.	Relative Aktivität			P in γ	Spezif. Aktivität Imp/Min/γP
		Imp./Min. (Mittelw.)	-BW	xUmrech- nungsfakt.		
			20	1.63		
Lecithin und PÄ	2	53	33	54	5.4	10
	4	73	53	86	3.8	22.6
	8	166	146	238	4.5	53
	16	149	129	210	3.2	66
	32	376	356	580	5.0	116
Phosphati- dylserin	2	28	-	-	3.4	-
	4	30	10	16	2.6	6.2
	8	63	43	70	2.7	25.9
	16	58	38	62	2.8	22.2
	32	144	124	202	3.6	56.2
			30	1.6		
Monophospho- inositid	2	84	54	86	1.06	81
	4	161	131	210	1.04	202
	8	97	67	107	0.88	122
	16	215	185	296	0.92	322
	32	279	249	399	1.9	210
Diphospho- inositid 1	2	62	32	51	0.32	159
	4	65	35	56	0.24	213
	8	83	53	85	0.3	283
	16	96	66	106	0.4	265
	32	152	122	195	0.5	390
Diphospho- inositid 2	2	61	31	50	0.56	89
	4	92	62	99	0.4	248
	8	77	47	75	0.32	247
	16	122	92	147	0.44	334
	32	188	158	253	0.52	506

BW = Blindwert

PÄ = Phosphatidyläthanolamin

e) Anfertigung einer Autoradiographie: Das Papierchromatogramm mit den aufgetrennten markierten Substanzen wurde in der Dunkelkammer auf einen 30 x 40 cm großen PERUTZ PER-X-Film gelegt und beides zusammen wieder in die lichtundurchlässige Filmtasche geschoben. Bei markierten Gehirner-Extrakten blieben Chromatogramm und Film unter guter Beschwerung drei Wochen aufeinander liegen. Bei Extrakten anderer Organe reichten kürzere Expositionszeiten.

Entwicklung: Der Film wurde bei völliger Dunkelheit vier Minuten entwickelt, unter fließendem Wasser abgespült und in das Fixierbad gelegt. Das Fixieren dauert bei Röntgenfilmen etwa 30 Minuten, also bedeutend länger, als man es von anderem Filmmaterial her gewöhnt ist und muß mindestens doppelt so lange durchgeführt werden als zur Entfernung der milchig-weißen Trübung nötig ist, da sonst ein Gelbschleier auftritt. Anschließend wird der Film nochmals eine Stunde gewässert, mit destilliertem Wasser abgespült und an einem staubfreien Ort zum Trocknen aufgehängt.

Entwickler: (AGFA Röntgen-Entwickler)

Wasser, (warm, unter 45°)	800.0 g
Metol	3.5 g
Natriumsulfit, wasserfrei	60.0 g
Hydrochinon	9.0 g
Soda, wasserfrei	40.0 g
Kaliumbromid	3.5 g
mit Wasser auf 1 Liter auffüllen	

Die Substanzen werden nacheinander in obenstehender Reihenfolge gelöst. Der fertige Entwickler wird filtriert und in Plastikflaschen aufbewahrt, aus denen vor dem Verschließen die Luft herausgedrückt wird.

Fixierbad: 125 g saures AGFA Fixiersalz werden in
1 Liter Wasser gelöst.

Auswertung: Wir schnitten das Autoradiogrammbild eines papierchromatographisch getrennten Extraktes aus, legten den Streifen von 4 x 40 cm zwischen zwei Glasscheiben in einen Spezialrahmen und schoben diesen in die Führungsschienen des ELPHOR-INTEGRAPH.

Vor Beginn der photometrischen Extinktionsmessung, die wir bei der Wellenlänge 546 m μ vornahmen, deckten wir den Spalt durch den die Durchleuchtung des Films erfolgt beidseitig soweit ab, daß beim Darüberführen des zu ~~ermessenden~~ Filmstreifens wohl die breiteste Stelle der diffusen Schwärzung noch durchstrahlt, von den Randpartien aber möglichst wenig erfaßt wurde. Nach Einstellen des Nullwertes auf den Filmuntergrund wurde der Anfang des Filmstreifens auf den Spalt geschoben, durch Schließen des Deckels die Photozelle über den Spalt gebracht und der Apparat zur Messung eingeschaltet. Millimeterweise mißt der ELPHOR-INTEGRAPH die Extinktion der Autoradiogrammflecke, zeichnet eine entsprechende Kurve auf, integriert sie und zeigt die Flächenwerte der einzelnen Fraktionen numerisch an.

f) Messung der prozentualen Verteilung von ^{32}P in den Phosphatiden von Rattenhirn-Ätherextrakten

Die Autoradiogramme von papierchromatographisch aufgetrennten Rattenhirn-Ätherextrakten wurden mit dem ELPHOR-INTEGRAPH gemessen und aus den Flächenwerten die prozentuale Verteilung des Phosphatid- ^{32}P nach verschiedenen langen Einbauezeiten erhalten, wie in Tabelle 25 aufgezeigt.

T a b e l l e 25

Substanz	^{32}P -Einbau									
	2 Std.		4 Std.		8 Std.		16 Std.		32 Std.	
	^{+)FW}	%	FW	%	FW	%	FW	%	FW	%
Lecithin und PÄ ++)	4.09	43.9	8.27	42.0	10.04	57.9	17.68	59.4	41.15	51.5
Phosphatidylserin	-	-	0.75	3.8	0.85	4.9	1.73	5.8	9.8	12.3
Monophospho- inositid	2.43	26.1	5.15	26.2	3.15	18.3	5.03	16.9	13.0	16.3
Diphospho- inositid 1	1.26	13.55	2.07	10.5	1.47	8.5	1.92	6.4	6.4	8.0
Diphospho- inositid 2	1.53	16.45	3.43	17.5	1.8	10.4	3.43	11.5	9.5	11.9
	9.31	100	19.67	100	17.31	100	29.79	100	79.85	100

(Inositphosphatide 56.1 54.2 37.2 34.8 36.2)

+) FW = Flächenwert

++) PÄ = Phosphatidyläthanolamin

D. Bezugsnachweis der Substanzen

1. Radioaktive Isotope:

$\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ in physiologischer Kochsalzlösung, steril, isotonisch: Farbenfabriken BAYER, Leverkusen

2. Vergleichssubstanzen für die Papierchromatographie:

Synthetisches Lecithin und Phosphatidyläthanolamin:

Dr. R. Hirt, Bern

Phosphatidylserin, isoliert aus Rinderhirn von:

Dr. J. Hölzl, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München;

Monophosphoinositid: isoliert aus Rinderleber von

Dr. J. Hölzl

Diphosphoinositid: isoliert aus Rinderhirn von

Dr. J. Hölzl

m-Inosit und Glycerinphosphat: Fa. Merck, Darmstadt,

Liste U Nr. 38/1960

L e b e n s l a u f

Am 5. Januar 1926 wurde ich, Felicitas Anna Lissau, als Tochter des Kaufmanns Fritz Lissau und seiner Ehefrau Elsa, geb. Lensch, in Berlin geboren.

Von 1932 - 1936 besuchte ich die Volksschule in Berlin, Wiesbaden, Ingolstadt und Regensburg, von 1936 - 1942 sechs Klassen Oberschule in Regensburg, Würzburg, Wien, Wiesbaden und Berlin.

Nach Ableistung des Pflichtjahrs in einer kinderreichen Familie in Berlin-Lichterfelde, wurde ich im November 1943 nach Parnen/Ostpreußen zum Arbeitsdienst eingezogen und arbeitete während der letzten Kriegsmonate in der Munitionsfabrik Ludwigsort.

Als ich im November 1945 aus der Ostzone nach München kam, fand ich eine Beschäftigung als Zimmermädchen, als Küchenhelferin und später als Bürokraft, bis mich Herr Professor Dr. L. Hörhammer am 16. April 1948 als technische Hilfskraft im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München einstellte. Am 1. Dezember 1950 erhielt ich eine Stelle als technische Assistentin am selben Institut.

Im Oktober 1950 wurde mir nach Ablegung der Begabtenprüfung die Zulassung zum Studium der Pharmazie erteilt. Meine Praktikantenzeit verbrachte ich in der Einhorn-Apotheke zu München und bestand am 24. September 1953 die pharmazeutische Vorprüfung. Im Wintersemester 1953 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität das Pharmaziestudium und legte am 20. November 1956 die pharmazeutische Prüfung ab. Die Bestallung als Apotheker erhielt ich am 21. November 1957.

Seit dem 16. Juni 1960 bin ich Verwalterin der Dienstgeschäfte einer wissenschaftlichen Assistentin am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

Vorliegende Arbeit fertigte ich am selben Institut in der Zeit von Dezember 1958 bis Dezember 1960 unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer an.

